

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C12N 1/21, C12P 13/00	A1	(11) 国際公開番号 WO97/48790 (43) 国際公開日 1997年12月24日 (24.12.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01886 (22) 国際出願日 1997年6月4日 (04.06.97) (30) 優先権データ 特願平8/155575 1996年6月17日 (17.06.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 桑原陽子(KUWABARA, Yoko)[JP/JP] 木村英一郎(KIMURA, Eiichiro)[JP/JP] 河原義雄(KAWAHARA, Yoshio)[JP/JP] 中松 亘(NAKAMATSU, Tsuyoshi)[JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 生産技術研究所内 Kanagawa, (JP)		(81) 指定国 HU, PL, SK, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
<p>(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING TARGET SUBSTANCES BY FERMENTATION</p> <p>(54)発明の名称 発酵法による目的物質の製造法</p> <div data-bbox="552 1155 1218 1617"></div> <p>(57) Abstract</p> <p>A process which aims at efficiently producing a target substance by fermentation while regulating the extra-chromosomal retention and detachment of a gene. The process comprises culturing and propagating a microorganism which retains a gene disadvantageously acting on the production of the target substance and a plasmid containing the replication origin of the temperature sensitivity wherein the gene capable of exhibiting its function is located exclusively on the plasmid at a temperature allowing the plasmid to replicate, then effecting the culture at a temperature at which the plasmid cannot replicate to thereby detach the plasmid from the cells, and then continuing the culture to thereby efficiently produce the target substance.</p>		

(57) 要約

染色体外での遺伝子の保持及び脱落を制御し、目的物質を効率よく発酵生産することを課題とする。

目的物質の産生に不利に作用する遺伝子と、温度感受性複製起点とを含むプラスミドを保持し、機能可能な前記遺伝子が前記プラスミド上のみに存在する微生物を、前記プラスミドが複製可能な温度で培養して増殖させ、続いて、プラスミドが複製不能な温度で培養してプラスミドを細胞から脱落させて培養を行うことにより、目的物質を効率よく産生させる。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
DK	デンマーク	LJ	リヒテンシュタイン				
EE	エストニア	LK	スリランカ				

明細書

発酵法による目的物質の製造法

5 技術分野

本発明は、発酵法による目的物質の製造法に関し、詳しくは、アミノ酸等の有用物質を効率よく製造する方法に関する。

背景技術

- 10 微生物を用いた発酵法による目的物質の生産効率を高めるために、目的物質の生産に不利に働く酵素、例えば目的物質を分解し、もしくは他の物質に変換する酵素、目的物質の生合成系路から分岐する他の経路に属する酵素等を欠損させ、あるいは弱化させた微生物を用いる方法が知られている。
- 15 例えば、コリネバクテリウム・グルタミカムのＬーリジン生産菌として、Ｌーリジンの生産性に最も影響を与える酵素といわれているホモセリンデヒドロゲナーゼ（以下、「HD」という）を欠損した変異株が知られている（Nakayama, K. et al.; J. Gen. Appl. Microbiol. 7(3), 145-154 (1961)）。このような変異株においては、Ｌーリジン合成系路
- 20 からアスパラギン酸β-セミアルデヒドを介して分岐するＬ-スレオニン固有の合成系路において、第一の反応であるアスパラギン酸β-セミアルデヒドからＬ-ホモセリンを生成する反応を触媒するHDが欠損しているためにＬ-スレオニンが合成されず、その結果、Ｌ-スレオニンによりフィードバック阻害を受けるアスパルトキナーゼ活性が阻害されず、
- 25 ず、Ｌーリジン合成反応が進行する。

- また、本発明者は、α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ（以下、「α-KGDH」という）遺伝子を含むプラスミドでコリネ型Ｌ-グルタミン酸生産菌を形質転換し、得られた形質転換体のα-KGDH活性のレベルとＬ-グルタミン酸の生産能を調べた結果、α-KGDH活性
- 30 が増強された株は、Ｌ-グルタミン酸の生産量が低下することを見いだしている。さらに、α-KGDH遺伝子が破壊されたコリネ型Ｌ-グルタミン酸生産菌は、過剰量のビオチンを含有する培地で培養したときに、界面活性剤やペニシリンのようなビオチン作用抑制物質を培地に添加することなく著量のＬ-グルタミン酸を生成蓄積することを見いだしている
- 35 る（WO95/34672号国際公開パンフレット）。通常、コリネ型Ｌ-グルタ

ミン酸生産菌は、ビオチン量を制限した培地で培養すると同細菌は少量のレーグルタミン酸を生産するが、ビオチンが過剰量存在する培地中で培養するとレーグルタミン酸を生産しないことが知られている。ビオチンの過剰量存在下でレーグルタミン酸を生産させるには、培地に界面活性剤またはペニシリンを添加することが必要であるが、 α -KGDH遺伝子破壊株では、これらの物質を添加しなくてもレーグルタミン酸を生産する（WO95/34672号国際公開パンフレット）。

さらに、本発明者は、ビオチンの制限または界面活性剤もしくはペニシリンの添加が、どのような作用機作を通じてコリネ型細菌のレーグルタミン酸の生産性に影響するかについて研究を行った結果、レーグルタミン酸生産に関与すると思われる遺伝子の存在を突き止めた（以下、この遺伝子を「dtsR遺伝子」、同遺伝子がコードする蛋白質を「DTSR蛋白」と称する。）。そして、このdtsR遺伝子が破壊された株は、野生株がほとんどレーグルタミン酸を生成しない量のビオチンが存在する条件においても少量のレーグルタミン酸を生成することを確認した（WO95/23224号国際公開パンフレット）。

以上のように、特定の遺伝子を欠損させることにより、目的物質の生産量を増大させることができる一方、これらの遺伝子の欠損は微生物の生育にとっては好ましくない場合がある。例えば、HD欠損株はレスレオニン及びレメチオニンを合成できないために、培地中にこれらのアミノ酸が存在しないと生育することができない。また、DTSRタンパク欠損株は、高いレーグルタミン酸生産能を有するが生育速度が遅く、培養にオレイン酸を必要とする（WO95/23224号国際公開パンフレット）。そのためにオレイン酸又はその誘導体を添加して培養する必要があるが、オレイン酸又はその誘導体の添加は、原料コストを上昇させるだけでなく、それ自体が生育抑制作用を持つために、DTSRタンパク欠損株の生育を悪くする。同様に、 α -KGDH欠損株は野生株に比べて生育がよくないという問題がある。

したがって、微生物を増殖させるという観点からは、上記のような遺伝子は細胞内に保持されていることが好ましい。特定の遺伝子を、菌体を増殖させる際には染色体に保持させ、目的物質を産生させる際にはその遺伝子を染色体から脱落させる方法が知られている。例えば、エシェリヒア・コリにおいて、菌体を増殖させた後に、溶原性入フェージの温度感受性リプレッサーを利用して、染色体からチロシン生合成系遺伝子を脱落させ、フェニルアラニンを製造する方法が開示されている（特開

昭61-247389号公報)。この方法は、予め溶原性λファージを用いて遺伝子を染色体DNAに組み込む必要があり、その際にλファージDNAが組み込まれる染色体DNAの領域に存在する遺伝子を破壊する可能性がある。しかし、細胞内における特定遺伝子の保持と脱落を、
5 染色体外で制御することにより、目的物質を効率よく製造する方法は知られていない。

染色体遺伝子を改変する方法として、温度感受性複製起点を有するプラスミドを用いる方法が知られている(特公平7-108228号公報)。この方法は、目的遺伝子が温度感受性複製起点を有するプラスミドに挿入された組換えDNAを微生物細胞に導入し、染色体DNAに目的遺伝子を組み込み、その後、高温で培養して組換えDNAを細胞から脱落させることによって、染色体への遺伝子の組み込み、あるいは染色体上の遺伝子の脱落を計画的に行おうとするものである。すなわち、この方法は、染色体上の遺伝子を恒久的に改変することを主な目的とするものであって、培養中における染色体外での遺伝子の保持と脱落を制御し、それによって微生物の増殖と目的物質の効率的な産生とを両立させようとするものではない。

本発明は、上記観点からなされたものであり、目的物質の産生に不利に作用する遺伝子であって、特に微生物の生育にとっては有利に作用する遺伝子の、染色体外での保持及び脱落を制御し、それによって、微生物の増殖と目的物質の産生とを両立させ、目的物質を効率よく製造する方法を提供することを課題とする。

発明の開示

25 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、温度感受性複製起点を含むプラスミド(以下、「温度感受性プラスミド」ともいう)を用いることにより、特定の遺伝子の細胞内における保持及び脱落を制御することができ、それによって目的物質を効率よく製造することに成功し、本発明に至った。すなわち本発明は、目的物質の産生に不利に作用する遺伝子と、温度感受性複製起点とを含むプラスミドを保持する微生物である。

35 また本発明は、この微生物を、前記プラスミドが複製可能な温度で培養して増殖させる工程と、前記プラスミドが複製不能な温度で培養してプラスミドを細胞から脱落させ、目的物質を産生させる工程とを含む、発酵法による目的物質の製造法を提供する。

前記目的物質としては、微生物を用いた発酵法により産生され得る物質であって、その産生に特定の遺伝子産物が不利に作用するものであれば特に制限されず、具体的には、 L -グルタミン酸、 L -リジン、 L -フェニルアラニン、チロシン等のアミノ酸、グアニル酸、イノシン酸等の核酸類、ビタミン類、抗生物質、成長因子、生理活性物質、タンパク質などが挙げられる。また、現在微生物を利用して生産されていない物質であっても、微生物によって生合成され得るものであれば本願発明を適用することができる。

目的物質の産生に不利に作用する遺伝子とは、目的物質の産生量を減少させる作用を有する遺伝子の他、その遺伝子が存在するときには目的物質の産生に特定の物質が必要となる遺伝子等を含む。前記遺伝子として具体的には、目的物質の生合成系路から分岐する他の経路に属する酵素、特にその経路の律速段階となる反応を触媒する酵素をコードする遺伝子が挙げられる。言い換えれば、目的物質の生合成系路にある中間体またはこの経路に流入する中間体の量を減少させる酵素をコードする遺伝子である。また、前記遺伝子として、目的物質を分解し、もしくは他の物質に変換する酵素をコードする遺伝子が挙げられる。

本発明においてこれらの遺伝子は、好ましくは、微生物の生育にとって有利に作用する遺伝子である。微生物の生育にとって有利に作用する遺伝子とは、その遺伝子が機能すると、機能しない場合と比較して生育がよくなる遺伝子、その遺伝子が機能すると、機能しない場合に微生物の生育に必要な特定の物質を必要としなくなる遺伝子等が含まれる。

前記遺伝子と目的物質との組み合わせとして具体的には、 dtsR 遺伝子もしくは $\alpha\text{-KGDH}$ 遺伝子と L -グルタミン酸、 HD 遺伝子と L -リジン、 tyrA 遺伝子と L -フェニルアラニン、 pheA 遺伝子と L -チロシン、 purA 遺伝子とグアノシン、 guaB 遺伝子とアデノシン、 purA 遺伝子及び guaB 遺伝子とイノシン等が挙げられる。

DTSR 欠損株は、 dtsR 遺伝子を有する株がほとんど L -グルタミン酸を生成しない量のピオチンが存在する条件においても著量の L -グルタミン酸を生成することができる。一方、 DTSR 欠損株は、培養にオレイン酸を必要とする。

$\alpha\text{-KGDH}$ 欠損株は、ピオチンの過剰量存在下でも、培地に界面活性剤またはペニシリンを添加しなくても L -グルタミン酸を生産する一方、 $\alpha\text{-KGDH}$ 欠損株は、野生株に比べて生育がよい。

また、 HD 欠損株は、 L -スレオニンが合成されず、その結果、 L -

スレオニンによりフィードバック阻害を受けるアスパルトキナーゼ活性が阻害されずに、レーリジン合成反応が進行する。一方、HD欠損株はレスレオニン及びレメチオニンを合成できないために、培地中にこれらのアミノ酸が存在しないと生育することができない

- 5 本発明の微生物は、上記のような遺伝子を含む温度感受性プラスミドを保持し、かつ、機能可能な前記遺伝子を染色体DNA上に保持しない微生物である。温度感受性プラスミドは、複製起点が温度感受性であるために、低温、例えば20℃では自律増殖することができるが、高温、例えば34℃では自律増殖することができず、これを保持する微生物が
- 10 分裂を繰り返す毎にプラスミドのコピー数が減少するために、プラスミドを保持しない微生物が大勢を占め、実質的に脱落する。したがって、特定の遺伝子を含む温度感受性プラスミドを導入された形質転換体は、低温で培養すれば前記遺伝子を細胞内に保持し、高温で培養すれば前記遺伝子を欠損する。本願の実施例で用いた温度感受性プラスミドは、上
- 15 記のように低温では複製可能であり、高温では複製不能であるが、これとは反対に、低温では複製不能であり、高温では複製可能な温度感受性複製起点が得られれば、これを用いてもよい。以下の記載において、温度感受性プラスミドが複製不能な温度を高温として説明するが、これは低温である可能性を排除する意図ではない。
- 20 尚、本発明に用いる微生物として、*recA*-株を用いると、低温で培養中にプラスミド上の遺伝子が染色体へ組み込まれるのを防ぎ、遺伝子の脱落を確実にすることができる点で好ましい。
- 遺伝子の保持、脱落の効果を高めるためには、機能可能な前記遺伝子を温度感受性プラスミド上のみに保持することが好ましい。すなわち、
- 25 染色体DNA上または温度感受性プラスミド以外の他のプラスミド上に機能可能な遺伝子が存在していると、温度感受性プラスミドを脱落させても、前記遺伝子が細胞内に維持されるため、プラスミド脱落による効果は低くなる。機能可能な遺伝子を温度感受性プラスミド上のみに保持させるには、例えば、染色体上に存在する前記遺伝子を変異、または破壊して、活性のあるその遺伝子産物を生成しないようにすればよい。具
- 30 体的には、遺伝子のプロモーターに変異を起こさせ、その遺伝子が発現しないようにしてもよく、また、コード領域に塩基の置換、欠失、挿入、付加又は転移等の変異を生じさせ、発現産物が活性を失なうようにしてもよい。また、遺伝子を破壊する方法として、欠失型遺伝子と染色体上
- 35 の正常遺伝子との相同組換えによる遺伝子破壊法があるが、この方法は、

復帰変異の可能性が極めて低い点で好ましい。尚、問題となる遺伝子を元来有していない微生物を使用する場合には、遺伝子の変異または破壊を必要としない。

- 尚、温度感受性プラスミド上に保持させる遺伝子と、欠損させる染色体DNA上の遺伝子は、同一である必要はなく、実質的に同一の機能を有するものであればよい。例えば、微生物の染色体上に存在する固有の遺伝子を欠損させ、その遺伝子と同一の機能を有する外来の遺伝子を含む温度感受性プラスミドをその微生物に保持させてもよい。

- 本発明に用いる微生物としては、目的物質の発酵生産に用いることができ、遺伝子組換え技術の適用が可能であり、温度感受性複製起点が得られるものであれば特に制限されない。このような微生物としては、例えば、コリネ型細菌、エシェリヒア属細菌、セラチア属細菌が挙げられる。また、現在、遺伝子組換えが行われていないものであっても、将来遺伝子組換えが可能になれば、本発明を適用することができる。

- 本発明に用いる微生物として具体的には、コリネ型細菌が挙げられる。本発明にいうコリネ型細菌とは、バーゲーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌であり、従来ブレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたブレバクテリウム属細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)) を含み、またコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なブレバクテリウム属細菌及びミクロバテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として、

- 以下のものが挙げられる。
- コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム
 - コリネバクテリウム・アセトグルタミカム
 - コリネバクテリウム・カルナエ
 - コリネバクテリウム・グルタミカム
 - コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 - コリネバクテリウム・メラセコーラ
 - ブレバクテリウム・ディバリガタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 - ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・インマリオフィラム
ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・
グルタミカム)

- ブレバクテリウム・ロゼウム
5 ブレバクテリウム・サッカロリティカム
 ブレバクテリウム・チオゲニタリス
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス
 具体的には、下記のような菌株を例示することができる。
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC 13870
10 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC 15806
 コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13020
 コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカ
 ム) ATCC 15990
15 コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC 17965
 ブレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタ
 ミカム) ATCC 14020
 ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカ
 ム) ATCC 14067
20 ブレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC 14068
 ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・
 グルタミカム) ATCC 13869
 ブレバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825
 ブレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC 14066
25 ブレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC 19240
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ 12340 (FER
 M BP-1539)

- これら入手するには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コ
 レクション (ATCC: アメリカ合衆国 20852、メリーランド、
30 ロックビル、パークローンドライブ 12301) より分譲を受けること
 ができる。すなわち、各微生物ごとに対応する登録番号が付与されてお
 り、この登録番号を引用して分譲を受けることができる。各微生物に対
 応する登録番号はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカ
 タログに記載されている。

- 35 本発明の微生物を温度感受性プラスミドが複製可能な温度 (例えば低

- 温)で培養すると、前記プラスミドは微生物細胞中に保持され、前記プラスミドに含まれる遺伝子は機能し得る。次に前記微生物を温度感受性プラスミドが複製不能な温度(例えば高温)で培養すると、前記遺伝子はプラスミドとともに細胞から脱落する。したがって、本発明の微生物
- 5 を所望の細胞密度になるまで低温で培養し、しかる後に高温で培養してプラスミドを脱落させ、さらに培養を続けることによって、微生物の増殖と目的物質の効率的な産生とを両立させることができる。プラスミドを脱落させた後は、目的物質の産生に好ましい温度に応じて、高温のまま培養してもよいし、再び低温に戻して培養してもよい。高温で培養を
- 10 続ければプラスミドを保持する細胞が増加することを防止することができる。高温で培養することが目的物質の産生に好ましくない場合には、低温に戻して培養すればよい。低温で培養すると、残存するプラスミド保持細胞が増加することがあるが、プラスミドを保持しない細胞が優勢な間に目的物質の産生を効率よく行なわせることができる。
- 15 温度シフトの態様として、具体的には、種培養を低温で行い、主発酵培地での培養(本培養)を高温で行う方法が挙げられる。また、前培養の途中、又は本培養の途中で温度シフトを行ってもよい。尚、菌体の増殖工程とプラスミドの脱落工程は、明確に区分されるものではなく、プラスミドの脱落工程は菌体の増殖を伴う。
- 20 温度シフトのタイミングは、用いる遺伝子、微生物、温度感受性複製起点、培養条件、及び目的物質の種類によっても異なるが、温度シフトまでの培養時間を変えて予備実験を行うことにより、低温での培養時間を容易に決定することができる。一般的には、対数増殖期において所望の細胞密度に達するまで培養した後、プラスミドが複製不能な温度にシフトすればよい。
- 25 培養に用いる培地は特に制限されず、使用する微生物に適した培地を用いればよい。例えば、コリネ型細菌の培養に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養素を含有する通常の培地である。
- 30 炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースや澱粉加水分解物などの糖類、エタノールやイノシトールなどのアルコール類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。
- 窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アン
- 35 モニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、ア

ンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。有機微量栄養素としては、ビタミンB1などの要求物質または酵母エキス等を必要に応じ適量含有させる

5 ことが望ましい。

培養は好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は20℃～45℃に、培養中pHは5～8.5に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

10 本発明によれば、例えば、dtsR遺伝子を温度感受性プラスミド上に保持する株は、過剰量のビオチンを含む培地を用いても、著量のレーグルタミン酸を生成することができる。

α-KGDH遺伝子を温度感受性プラスミド上に保持する株は、過剰量のビオチンを含む培地を用いても、培地に界面活性剤またはペニシリンを添加せずにレーグルタミン酸を生成することができる。尚、培地に
15 界面活性剤やペニシリンを添加したり、培地中のビオチンを制限したりすることによりグルタミン酸収率を更に向上させることも出来る場合がある。

また、HD遺伝子を温度感受性プラスミド上に保持する株は、レース
20 レオニン及びレーメチオニンを含まない培地を用いても、レーリジンを効率よく生成することができる。

発酵液からの目的物質の採取は、通常の発酵生産による物質の製造法と同様にして行えばよい。例えば、アミノ酸は、イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせるにより培地から採取するこ
25 とができる。

図面の簡単な説明

図1は、遺伝子組込み及び遺伝子置換の概念図である。

図2は、α-KGDH遺伝子を含むDNA断片の制限酵素地図である。

30

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明に好適に用いられる遺伝子とその遺伝子を欠損する微生物、及び温度感受性プラスミドについて説明する。ここでは、説明を具体的にするために主としてコリネ型細菌について記載するが、前述し

35 たように本発明はコリネ型細菌に限定されるものではない。

< 1 > 本発明に用いる遺伝子

(1) d t s R 遺伝子

d t s R 遺伝子は、コリネ型細菌由来の界面活性剤耐性に関与する遺伝子として本発明者らによって単離された遺伝子である。コリネバクテ
5 リウム属細菌由来の d t s R 遺伝子を含む DNA 断片のヌクレオチド配列を配列表配列番号 1 に示す。この配列のうち d t s R 遺伝子のコード領域は、467~469番目の A T G から1985~1987番目の C T G にいたる配列を少なくとも有する。

前記467~469番目の A T G の上流にさらに A T G (ヌクレオチド番号
10 359~361) が同一フレームで存在し、この A T G が開始コドンである可能性は否定できないが、この遺伝子の上流領域に存在するコンセンサス配列の解析から前記467~469番目の A T G が開始コドンであると推定される。すなわち、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のうちアミノ酸番号 3 7 ~ 5 4 3 からなるアミノ酸配列が、D T S R 蛋白のアミノ酸配列
15 であると推定される。本願明細書において D T S R 蛋白のアミノ酸配列及び d t s R 遺伝子の塩基配列について言及している場合、467~469番目の A T G を開始コドンとして記載されていることがあるが、359~361番目の A T G が開始コドンである可能性も考慮されたい。したがって、コリネ型細菌に d t s R 遺伝子を導入しようとする場合、配列番号
20 1 に示す塩基配列のうちヌクレオチド番号467~1987からなる配列を発現させればよいと考えられるが、ヌクレオチド番号359~466を含めて配列番号 1 に示す塩基配列のコード領域及び上流領域をコリネバクテリウム属細菌に導入すれば、いずれの A T G が開始コドンであっても D T S R 蛋白を正しく発現させることができることは当業者に容易に理解されるであらう。尚、d t s R 遺伝子が菌体内で発現する際、開始コドンによってコードされる N 末端の M e t はアミノペプチダーゼによって切断される場合もある。

d t s R 遺伝子を含むプラスミド p D T R 6 をエシェリヒア・コリ
J M 1 0 9 に導入して得られた形質転換株は、A J 1 2 9 6 7 と命名され、1994年2月22日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号 F E R M P - 1 4 1 6 8 として寄託され、1995年2月9日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号 F E R M B P - 4 9 9 4 が付与されている(WO95/23224号国際公開パンフレット)。
35 d t s R 遺伝子を含む DNA 断片は、上記寄託菌株から p D T R 6 を回

収し、プラスミドDNAを制限酵素KpnI及びXbaIで切断することにより得られる。

- dtsR遺伝子は、配列番号1に示す塩基配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、コリネ型細菌染色体DNAを鋳型とするポリメラーゼチェーンリアクション法（PCR：polymerase chain reaction；White, T.J. et al ; Trends Genet. 5, 185 (1989) 参照）によって、dtsR遺伝子を含むDNA断片を増幅することによっても得られる。PCR反応に用いるプライマーとしては、塩基組成がランダムでG+C含量が50%付近であり、特殊な2次構造を形成せず、互いに相補的でない、との条件を満たすものであればどのような配列でもよい。長さは通常20ないし30塩基のものがよく用いられる。また、プライマーとしては、dtsR遺伝子の少なくとも全コード領域を含むDNA二重鎖の両3'末端の塩基配列に相補的な塩基配列を有する2本のオリゴヌクレオチドが好ましい。

- オリゴヌクレオチドの合成は、ホスホアミダイト法（Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981) 参照）等の常法により、市販のDNA合成装置（例えば、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380B等）を用いて合成することができる。PCR反応は、市販のPCR反応装置（宝酒造（株）製DNAサーマルサイクラー PJ2000型等）を使用し、TaqDNAポリメラーゼ（宝酒造（株）より供給されている）を用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

- また、コリネ型細菌の染色体DNAライブラリーから、配列番号1に示す塩基配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブを用いるコロニーハイブリダイゼーションによっても、dtsR遺伝子を含むDNA断片は取得できる。

- 染色体DNAライブラリーは、以下のようにして作製することができる。まず、コリネ型細菌から斎藤、三浦の方法（H.Saito and K.Miura Biochem.Biophys.Acta 72, 619, (1963)）等により染色体DNAを調製する。該染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3AIを、温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1～10ユニット/mlで様々な時間（1分～2時間）染色体DNAに作用させてこれを消化する。

- ついで、切断された染色体DNA断片を、エシェリヒア・コリ（E. coli）細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを

作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素 *Sau3A* I
と同一末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えば *Bam* H I を、温度
30℃以上、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好
ましくは1～3時間、ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、
5 切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物
と開裂切断されたベクターDNAを混合し、これにDNAリガーゼ、好
ましくはT4DNAリガーゼを、温度4～16℃、酵素濃度1～100
ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6～24時間作用させ
て組換えDNAを得る。

- 10 *E. coli*細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミ
ドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、
例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、
RSF1010等が挙げられる。

- また、これらのベクターにコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可
15 能にする能力をもつDNA断片（例えば、pAM 330（特開昭58-67699号
公報参照）、pHM 1519（特開昭58-77895号公報参照）、pCG 1（特開昭
57-134500号公報参照）、pCG 2（特開昭58-35197号公報参照）、pCG
4（特開昭57-183799号公報参照）、pCG 11（特開昭57-183799号公報参
照）等から調製できる）を挿入すると、*E. coli*及びコリネ型細菌の両
20 方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することがで
きる。

このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、
それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の寄託番号を
かっこ内に示した。

- 25 pAJ655 *Escherichia coli* AJ11882 (FERM BP-136)
Corynebacterium glutamicum SR8201 (ATCC39135)
pAJ1844 *Escherichia coli* AJ11883 (FERM BP-137)
Corynebacterium glutamicum SR8202 (ATCC39136)
pAJ611 *Escherichia coli* AJ11884 (FERM BP-138)
30 pAJ3148 *Corynebacterium glutamicum* SR8203 (ATCC39137)
pAJ440 *Bacillus subtilis* AJ11901 (FERM BP-140)

得られた組換えDNAを用いて、例えば *E. coli* K-12株を形質転換し
て染色体DNAライブラリーを作製する。この形質転換は

- D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology, 68, 326, 1979) あるい
35 は受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法

(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159 (1970)) 等により行うことができる。

ハイブリダイゼーションにより選択された形質転換株から、*dt s R* 遺伝子を含む組換え DNA を、例えば P. Guerry らの方法 (J.

5 Bacteriol., 116, 1064, (1973))、D. B. Clewell の方法

(J. Bacteriol., 110, 667, (1972)) などにより単離することができる。

DNA の切断及び連結、形質転換、形質転換株からの組換え DNA の抽出、及びコロニーハイブリダイゼーション等の一般的な遺伝子組換えに用いられる技術は、当業者によく知られた書籍、例えばモレキュラー

10 ・クローニング (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 等に詳述されている。

(2) HD 遺伝子

コリネ型細菌の HD 遺伝子は、本発明者らにより取得されている

15 (WO95/23864号国際公開パンフレット)。プレバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12036 株 (FERM BP-734) の HD 遺伝子の塩基配列及びこの配列から推定されるアミノ酸配列を、配列表配列番号 3 に示す。さらに、アミノ酸配列を配列表配列番号 4 に示す。この配列と Peoples ら報告したコリネバクテリウム・グルタミカムの HD 遺伝子の配列

20 (Peoples, O. P. et al., Molecular Microbiology, 2(1), 63-72 (1988)) を比較したところ、4ヶ所に塩基の相違があり、そのうち1ヶ所はアミノ酸レベルでの相違であった。この相違点をコリネバクテリウム・グルタミカムの HD 遺伝子の配列を基準として以下に示す。

① 531 G → C (148 Gly → 148 Ala)

25 ② 1222 G → C

③ 1318 G → T

④ 1324 C → G

コリネ型細菌の各野生株の HD 遺伝子の配列の間に認められるこのような相違は、HD 活性に影響するものではなく、コリネバクテリウム・

30 グルタミカムの HD 遺伝子の配列も上記のプレバクテリウム・ラクトファーマンタムの HD 遺伝子の配列と同等のものとして扱うことができる。尚、HD 遺伝子においても、開始コドンがコードするメチオニン残基は除去されている可能性がある。

本願実施例に用いた HD 遺伝子は、コリネバクテリウム・グルタミカ
35 ムについて既知となっている配列 (Peoples, O. P. et al.; Molecular

Microbiology, 2(1), 63-72 (1988)) を基にして合成したオリゴヌクレオチド(配列番号5及び配列番号6)をプライマーとし、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12036株(FERM BP-734)の染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、HD遺伝子を含むDNA断片を増幅することによって取得されたものである。

PCR法に用いるプライマーは上記のものに限られず、配列番号3に示す塩基配列を基に作製することができる。プライマーとしては、塩基組成がランダムでG+C含量が50%付近であり、特殊な2次構造を形成せず、互いに相補的でない、との条件を満たすものであればどのような配列でもよい。長さは通常20ないし30塩基のものがよく用いられる。プライマーとしては、HD遺伝子の少なくとも全コード領域を含むDNA二重鎖の両3'末端の塩基配列に相補的な塩基配列を有する2本のオリゴヌクレオチドが好ましい。

また、コリネ型細菌の染色体DNAライブラリーから、配列番号3に示す塩基配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブを用いるハイブリダイゼーションによっても、HD遺伝子を含むDNA断片は取得できる。

尚、染色体DNAライブラリーを、E. coliを用いて作製した場合には、HDのC末端側約100アミノ酸残基に対応する領域の中からプローブに用いる配列を選択することが好ましい。なぜなら、E. coliのHD遺伝子は2種類(HD-1、HD-2)存在することが知られている

(Zakin, M. M. et al; J.B.C., 258, 3028-3031 (1983)) が、これらはいずれもコリネバクテリウム・グルタミカムHDのC末端側約100アミノ酸残基に対応する領域が存在しないので、この領域の中からプローブに用いる配列を選択すると、E. coli染色体上のHD遺伝子にはハイブリダイズしないからである。

増幅されたDNA断片がHDをコードする遺伝子の全長を含んでいない場合には、染色体DNAを上記染色体DNAライブラリーの作製に用いたのと別の制限酵素で切断し、再度染色体DNAライブラリーを作製し、再びハイブリダイゼーションによる選択と制限酵素断片の解析を行うことによりHD遺伝子の全長を含むDNA断片を取得することができる。この時、プローブとして初めに取得したDNA断片を用いることにより、ハイブリダイゼーションをより容易に行うことができる。

オリゴヌクレオチドの合成や染色体DNAライブラリーの調製は、(1)と同様にして行うことができる。

(3) α -KGDH遺伝子

コリネ型細菌の α -KGDH遺伝子は、本発明者らにより取得されている(WO95/34672号国際公開パンフレット)。プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869由来の α -KGDH遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を配列表配列番号7に示す。この塩基配列からオープン・リーディング・フレームを推定し、その塩基配列より推定される産物のアミノ酸配列を配列番号8に示す。なお、蛋白質のN末端にあるメチオニン残基は開始コドンであるATGに由来するため蛋白質本来の機能とは無関係であることが多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記 α -KGDH蛋白質の場合にもメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。

α -KGDH遺伝子を含むプラスミドpPKS-Xをプレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11060(特公昭59-10797号公報)に導入して得られた形質転換株は、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12999と命名され、平成6年6月3日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号FERM P-14349で寄託され、平成7年6月2日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5123が付与されている。

α -KGDH遺伝子を含むDNA断片は、上記寄託菌株からpPKS-Xを回収し、プラスミドDNAを制限酵素SalI及びXbaIで切断することにより得られる。

大腸菌の α -KGDH複合体は、E1(α -ketoglutarate dehydrogenase: EC 1.2.4.2)、E2(dihydrolipoamide succinyltransferase: EC 2.3.1.61)、E3(lipoamide dehydrogenase: 1.6.4.3)の3つのサブユニットで構成され、E1、E2遺伝子はオペロン構造を成し、E3はピルビン酸脱水素酵素(pyruvate dehydrogenase: EC 1.2.4.1)と共有していることが知られている。大腸菌のE1、E2遺伝子のヌクレオチド配列は明らかにされている(Eur. J. Biochem., 141, 351 (1984)、Eur. J. Biochem., 141, 361 (1984))。

また、枯草菌についても同様に、E1、E2遺伝子のヌクレオチド配列が明らかにされている(J. Bacteriol., 171, 3667 (1989)、Gene, 61, 217 (1987)等)。

上記プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 1386

9 由来の α -KGDH 遺伝子は、大腸菌と枯草菌の E 1 遺伝子の塩基配列との相同性を利用して、単離及びクローン化されたものである。すなわち、大腸菌と枯草菌の α -KGDH・E 1 サブユニット遺伝子間で相同性の高い領域を選び、配列表配列番号 9 及び 10 に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 株の染色体 DNA を鋳型とする PCR 法によって、 α -KGDH 遺伝子を含む DNA 断片を増幅した。

PCR 法に用いるプライマーは上記のものに限られず、配列番号 7 に示す塩基配列を基に作製することができる。プライマーとしては、塩基組成がランダムで G+C 含量が 50% 付近であり、特殊な 2 次構造を形成せず、互いに相補的でない、との条件を満たすものであればどのような配列でもよい。長さは通常 20 ないし 30 塩基のものがよく用いられる。また、プライマーとしては、 α -KGDH 遺伝子の少なくとも全コード領域を含む DNA 二重鎖の両 3' 末端の塩基配列に相補的な塩基配列を有する 2 本のオリゴヌクレオチドが好ましい。

また、コリネ型細菌の染色体 DNA ライブラリーから、配列番号 7 に示す塩基配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブを用いるハイブリダイゼーションによっても、 α -KGDH 遺伝子を含む DNA 断片は取得できる。

オリゴヌクレオチドの合成や染色体 DNA ライブラリーの調製は、(1) と同様にして行うことができる。

< 2 > 温度感受性複製起点及びこれを含有するプラスミド

温度感受性複製起点は、微生物細胞内で自律増殖可能であり薬剤耐性を有するプラスミドを変異処理し、そのプラスミドで微生物を形質転換し、薬剤を含む培地で低温では生育でき、高温では生育できない形質転換株からプラスミドを回収することによって得られる。

プラスミドの変異処理は、例えばプラスミドをインビトロでヒドロキシルアミン処理する方法 (G. O. Humpherys et al : Molec. gen. Genet. 145, 101-108 (1976) などがある) が挙げられる。

ここでいう「低温」とは、「高温」に対する相対的な概念であり、低温と高温との境界は特に制限されるものではないが、少なくとも「低温」とは微生物を培養したときに微生物が増殖できる温度範囲であり、また、「高温」とは微生物自体が死滅しない温度範囲である。これら低温と高温との境界は、温度感受性プラスミドを保持する形質転換体を、

薬剤を含む培地で温度を変えて培養し、生育できない温度の下限を調べることによって、決定することができる。

5 コリネ型細菌細胞内で機能する温度感受性複製起点を有するプラスミドとしては、pHS4、pHS22、pHS23が挙げられる。これらは、エシェリヒア・コリと、コリネ型細菌の双方の菌体中で自律増殖可能であり、カナマイシン耐性を有するプラスミドベクター、pHK4をインビトロでヒドロキシルアミン処理し、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムを形質転換し、カナマイシン25 μ g/mlを含むM-CM2Gプレート上で低温(20℃)で生育でき、高温(34℃)では
10 生育できない形質転換株から回収されたプラスミドである(特公平7-108228号公報)。pHS4を保持するエシェリヒア・コリAJ12570は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号FERM P-11762として寄託され、1991
15 年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3523としてに寄託されている。

また、pHS4、pHS22、pHS23から切り出したコリネ型細菌由来の複製起点を含む各々のDNA断片を、エシェリヒア・コリ用のベクターであるpHSG398に接続して得られたプラスミドpHSC
20 4、pHSC22、pHSC23も、同様に温度感受性プラスミドとして本発明に使用することができる。pHSC4、pHSC22、pHSC23は、コリネ型細菌、及びエシェリヒア・コリ中で自律増殖して、宿主にクロラムフェニコール耐性を付与する(特公平7-108228号公報参照)。pHSC4を保持するエシェリヒア・コリAJ1257
25 1は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524の受託番号で寄託されている。また、pHSC22を保持するエシェリヒア・コリAJ12615、及びpHSC23を保
30 持するエシェリヒア・コリAJ12616は、1991年4月24日に、各々順にFERM P-12213、FERM P-12214の受託番号で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、各々順にFER
35 M BP-3530、FERM BP-3531の受託番号が付与され

ている。

これらの温度感受性プラスミドはコリネ型細菌細胞中において、約 10 ~ 32 °C では自律増殖できるが、約 34 °C 以上では自律増殖できない。

温度感受性複製起点を有する DNA 断片は、例えば上記 pHSC4 を
5 BamHI と KpnI で切り出すことによって得られる。

尚、各々のプラスミドの温度感受性複製起点を含む領域の塩基配列は、特公平 7-108228 号公報に記載されている。

本発明に用いる温度感受性プラスミドは、温度感受性複製起点と目的物質の産生に不利に作用する遺伝子とを含むプラスミドである。このよう
10 うなプラスミドは、温度感受性複製起点を含む DNA 断片と、前記遺伝子を含む DNA 断片とを、T4 DNA リガーゼ等のリガーゼを用いて連結することによって得られる。また、温度感受性プラスミドは、これらの DNA 断片に加えて、E. coli で機能する複製開始点及び薬剤耐性遺伝子等のマーカーを含んでいると、プラスミドの調製に便利である。

15 <3> 宿主に用いる微生物

(1) 遺伝子欠損株

本発明の微生物は、上記のような目的物質の産生に不利に作用する遺伝子が、好ましくは前記プラスミド上のみに存在する微生物である。かかる微生物は、染色体 DNA 上に機能可能な前記遺伝子を保持しない宿
20 主微生物を、前記遺伝子を含む温度感受性プラスミドで形質転換することによって得られる。染色体 DNA 上に機能可能な前記遺伝子を保持しない宿主微生物は、染色体上に存在する各々の遺伝子を、正常に機能しないように変異させることによって得られる。変異は、遺伝子の転写又は翻訳を妨げる変異であってもよいし、機能しないタンパク質を産生す
25 るような変異であってもよい。また、遺伝子の一部または全部を欠失させる、すなわち遺伝子を破壊するものであってもよい。以下、機能可能な遺伝子を保持しない株を「欠損株」ともいう。

遺伝子欠損株は、野生型遺伝子を生産する微生物を紫外線照射または化学薬剤による処理を行い、実質的に機能を持つその遺伝子産物を産生
30 しない株を選択することによっても得られる。また、遺伝子欠損株は遺伝子組換えによる育種方法でも取得可能である。特に、遺伝子の取得がなされている場合は、遺伝子組換え法を用い相同組換え法により当該遺伝子の破壊が容易に実現される。相同組換えによる遺伝子破壊は既に確立しており直鎖 DNA を用いる方法や温度感受性プラスミドを用いる方法
35 などが利用できる。

- 具体的には、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., *Methods in Enzymology*, 154, 350 (1987)) や次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤による処理 (Shortle, D. and Nathans, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 270 (1978)) によって、欠損
- 5 させようとする遺伝子のコーディング領域またはプロモーター領域の塩基配列の中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせ、このようにして改変または破壊した遺伝子を染色体上の正常な遺伝子と置換することによりその遺伝子産物の活性を低下ないし消失させるかその遺伝子の転写を低下ないし消失させることができる。
- 10 部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対だけに、任意の置換、欠失、挿入、付加または逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、DNA塩基配列が決定されている目的遺伝子を持つプラスミドを変性させて一本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相
- 15 補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、この時合成オリゴヌクレオチドを完全に相補的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つようにしておく。この後一本鎖DNAと任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらにDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントとT
- 20 4リガーゼを用いて完全な2本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位が固定された遺伝子を含むプラスミドを持っている。遺伝子の変異を導入し、改変または破壊することができる同様な手法には、リコンビナント
- 25 PCR法 (PCR Technology, Stockton press (1989)) がある。
- また、化学薬剤処理を用いる方法は、目的の遺伝子を含むDNA断片を直接次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等で処理することによりDNA断片中にランダムに塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ変異を導入する方法である。
- 30 このようにして取得した変異が導入されて改変または破壊された遺伝子をコリネ型細菌等の微生物の染色体上の正常な遺伝子と置換する方法としては、相同性組換えを利用した方法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., *J. Bacteriol.*, 162, 1196 (1985)) がある。相
- 35 同性組換えは、染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド

等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所で組換えを起こし、導入されたプラスミド全体を染色体上に組み込む。この後さらに染色体上の相同性を有する配列の箇所で組換えを起こすと、再びプラスミドが染色体上から抜け落ちるが、この時組換えを起こす位置により変異が導入された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちることもある。このような菌株を選択することにより、塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ変異が導入されて改変または破壊された遺伝子が染色体上の正常な遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

10 相同組換えによる遺伝子破壊の方法を、コリネ型細菌の α -KGDH遺伝子破壊株を例にとって具体的に説明する(図1)。

プラスミドベクターにブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム由来の温度感受性複製起点と変異型 α -KGDH遺伝子とクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

20 こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在する α -KGDH遺伝子配列との組換えを起こし、染色体 α -KGDH遺伝子と変異型 α -KGDH遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分(ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー)を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では野生型 α -KGDHが優性であるので、野生株と同等の生育を示す。

次に、染色体DNA上に変異型 α -KGDH遺伝子のみを残すために、2個の α -KGDH遺伝子の組換えにより1コピーの α -KGDH遺伝子を、ベクター部分(温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカーを含む)とともに脱落させる。例えば、染色体組込み株を培養し、培養菌体を薬剤を含まない平板培地にまいて培養する。生育したコロニーを、薬剤を含む平板培地にレプリカして培養し、薬剤感受性株を取得する。得られた薬剤感受性株の染色体からベクター部分が脱落していることを、サザン・ハイブリダイゼーションにより確認し、さらに正常な α -KGDHを発現しないことを確認する。

35 上記の変異型 α -KGDH遺伝子として、 α -KGDHの一部をコー

ドする α -KGDH遺伝子、すなわち一部を欠失した α -KGDH遺伝子を用いて遺伝子置換を行うと、染色体 α -KGDH遺伝子が一部を欠失した α -KGDH遺伝子に置換された α -KGDH遺伝子破壊株が得られる。

- 5 上記と同様にして、dtsR遺伝子欠損株及びHD遺伝子欠損株を取得することができる。尚、HD遺伝子破壊株の作製に当たっては、HDはN末端側の領域が活性に関与していると予想されているので、HD遺伝子のうち欠失させる部位としては、N末端側の領域、例えばN末端から350アミノ酸以内の領域、例えば100~200番目、あるいは2
10 50~350番目のアミノ酸の領域が挙げられる。尚、HD遺伝子は、その下流に存在するホモセリンキナーゼと同一オペロン内にあるので、ホモセリンキナーゼの発現を阻害しないようにHD遺伝子のプロモーター部位は欠失させないことが好ましい。

- 組換えDNAをコリネ型細菌の細胞内に導入するには、E. coli K-12
15 について報告されている様に受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)、またはパチルス・ズブチリスについて報告されている様に細胞がDNAを取り込み得る様に増殖段階 (いわゆるコンピテントセル) に導入する方法 (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153 (1977)) により可能である。あるいは、パチルス・ズブチリス、放線菌類
20 および酵母について知られている様に (Chang, S. and Choen, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))、DNA受容菌を、
25 組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

- プロトプラスト法では上記のパチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得ることができるし、特開昭
57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウ
30 ム属のプロトプラストにポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブル
ロニックF68 (セルバ社) などの添加によってDNAのとり込みを促
35 進させる方法でも同等の結果が得られる。

さらには、電気パルス法（杉本ら、特開平2-207791号公報）によっても、組換えDNAをブレバクテリウム属またはコリネバクテリウム属細菌に属する受容菌へ導入できる。

本発明に用いることができる遺伝子破壊株として、例えばブレバク
5 テリウム・ラクトファーメンタム AJ12036株（FERM BP-734）に由来するHD破壊株は、ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム
AJ12846と命名され、1994年3月1日に通商産業省工業技術院生命
工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目
1番3号）に受託番号FERM P-14197として寄託され、1995年2月9
10 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4995の受託
番号で寄託されている。

温度感受性プラスミドを導入する宿主微生物は、*recA*- 変異株であることが好ましい。温度感受性プラスミドを保持する株を低温で培養
すると、プラスミドに含まれる正常な遺伝子と染色体DNA上の変異型
15 遺伝子との相同組換えを起こし、正常遺伝子が染色体へ組み込まれる可能性
があるが、該組込みが起こると高温で培養してプラスミドを宿主細胞
から脱落させても染色体上にプラスミドDNAとともに問題の正常な
遺伝子が残留する。このような相同組換えを防ぐためには、*recA*-
変異株を用いるとよい。

20 コリネ型細菌の*recA*遺伝子はすでに単離され、塩基配列が知られて
おり（特開平7-322879号公報、）、データベースにも登録されて
いる（EMBLアクセションナンバー：X77384）。この配列をもとに
プライマーを作製し、PCR法により*recA*遺伝子を単離することが
できる。さらに、得られた*recA*遺伝子を用いて上記と同様
25 にして*recA*遺伝子破壊株を取得すれば、*recA*- 株が得られる。
得られた株が*recA*- 株であることは、例えばマイトマイシンC、メ
チルメタンスルホネート等のDNAに障害を与える薬剤やUV照射に
対する感受性、又は相同組換え能を調べることによって支持される。
recA- 株は、*recA*+ 株に比べて前記薬剤やUV照射に対する感受性
30 が増加し、相同組換え能が低下する。PCR法により増幅した*recA*
遺伝子の内部配列を用いた*recA*遺伝子破壊株の創製については、*R.*
Fitzpatrick et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1994) 42,
575-580に詳しく記載されている。

尚、宿主に*recA*+ 株を用いた場合、問題の遺伝子が染色体DNA
35 に組み込まれた細胞が出現しても、培養中にプラスミドDNAの組込が

起こらない細胞が大勢を占めていれば差し支えない。そのような場合は、問題の遺伝子が染色体DNAに組み込まれていない細胞のシングルコロニーアイソレーションを行い、これを目的物質の製造に用いるとよい。

- また、宿主微生物の染色体DNA上に目的物質の産生に不利に作用する
5 遺伝子と相同な箇所がない場合には、*recA*⁺株を用いても上記の組み込みの問題は生じない。

(2) 目的物質産生に適した微生物

- 遺伝子欠損株の取得に用いる微生物には、目的物質を産生する能力を有する微生物を用いる。以下に、目的物質を産生する微生物の具体的な
10 例として、コリネ型細菌の各種L-アミノ酸生産菌を示す。

(i) L-リジン生産菌

- コリネ型細菌のL-リジン生産菌として、従来より種々の人工変異株が用いられている。このような人工変異株としては次のようなものがある。S-(2-アミノエチル)-システイン(以下、「AEC」と略記
15 する)耐性変異株、その生育にL-ホモセリンのようなアミノ酸を必要とする変異株(特公昭48-28078号、特公昭56-6499号)、AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株(米国特許第3708395号及び第38254
20 72号)、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸アナログ、サルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示すL-リジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵素または呼吸系酵素阻害剤に耐性を示すL-リジン生産変異株
(特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52
25 -102498号、特開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号)、イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株(特開昭55-9784号、特開昭56-8692号)、
30 フルオロピルビン酸または34℃以上の温度に対して感受性を示すL-リジン生産変異株(特開昭55-9783号、特開昭53-86090号)、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するブレビバクテリウムまたはコリネバクテリウムの変異株(米国特許第4411997号参照)等。

- 35 具体的には、以下のような株を例示することができる。

- プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12031 (FERM BP-277、特開昭60-62994号公報)
プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 39134 (特開昭60-62994号公報)
- 5 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ 3463 (FERM P-1987、特公昭51-34477号公報)
プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12435 (FERM BP-2294、米国特許第5,304,476号)
プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12592 (FERM BP-3239、米国特許第5,304,476号)
- 10 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ 12596 (FERM BP-3242、米国特許第5,304,476号)
プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 11446 (FERM P-5163、特開平2-207791号公報)
- 15 また、レーリジン生産性のE. coliとしては、レーリジンアナログに耐性を有する変異株が例示できる。このレーリジンアナログは、エシェリヒア属細菌の増殖を阻害するようなものであるが、その抑制はレーリジンが培地中に共存すれば、全体的または部分的に解除されるようなものである。例えば、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、AEC、
- 20 γ-メテルリジン、α-クロロカプロラクタム等がある。これらのリジンアナログに耐性を有する変異株は、通常的人工変異操作をエシェリヒア属の微生物に施すことにより得られる。レーリジン製造に用いる菌株として、具体的には、エシェリヒア・コリ AJ 11442 (FERM BP-1543、NRRL B-12185；特開昭56-18596
- 25 号及び米国特許第4346170号参照)が挙げられる。AJ 11442株は、1981年5月1日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に、受託番号 FERM P-5084として寄託されており、1987年10月29日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、
- 30 FERM BP-1543として寄託されている。以上の微生物のアスパルトキナーゼは、レーリジンによるフィードバック阻害が解除されている。
- その他にも、たとえばレースレオニン生産菌が挙げられる。レースレオニン生産菌も、一般的にはそのアスパルトキナーゼのレーリジンによる阻害が解除されているからである。E. coliのレースレオニン生産菌
- 35 としては、VKPM B-3996株が現在知られている内で最も高い生産能を

- 持っている。VKPM B-3996株は、1987年11月19日にUSSR オール・ユニオン・サイエンティフィック・センター・オブ・アンチバイオ
ティクス (All-Union Scientific Center of Antibiotics)
(Nagatinskaya Street 3-A, 113105 Moscow, Russian Federation) に、
5 登録番号 R I A 1867 のもとに寄託されている。

- 上記のレーリジン生産菌において、レーリジン生合成系遺伝子の増幅
のレーリジン生合成系遺伝子を強化してもよい。そのような遺伝子とし
ては、例えば、アスパラギン酸によるフィードバック阻害を解除する変
異を有するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺
10 伝子 (特公平7-83714号公報参照) が挙げられる。

(ii) レーグルタミン酸生産菌

- レーグルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌としては、コリネ型細
菌のグルタミン酸生産性野生株またはこれから誘導された変異株が挙げ
られる。このような変異株としては、例えば、

- 15 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム A J 1 2 4 7 5 (F E
R M B P - 2 9 2 2、米国特許第5,272,067号公報)

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム A J 1 2 4 7 6 (F E
R M B P - 2 9 2 3、米国特許第5,272,067号公報)

- 20 プレバクテリウム・フラバム A J 1 2 4 7 7 (F E R M B P -
2 9 2 4、米国特許第5,272,067号公報)

コリネバクテリウム・グルタミカム A J 1 2 4 7 8 (F E R M B
P - 2 9 2 5、米国特許第5,272,067号公報)

コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 2 1 4 9 2

等がある。

- 25 また、エシェリヒア・コリのレーグルタミン酸生産菌としては、
エシェリヒア・コリ A J 1 2 6 2 8 (F E R M B P - 3 8 5 4)
エシェリヒア・コリ A J 1 2 6 2 4 (F E R M B P - 3 8 5 3、
フランス特許出願公開第 2,680,178号参照)
エシェリヒア・コリ A J 1 2 9 4 9 (F E R M B P - 4 8 8 1 欧
30 州特許出願公開第 0,670,370号参照)
等が挙げられる。

- なお、レーグルタミン酸生産性を向上させるために、上記のグルタミ
ン酸生産菌のグルタミン酸生合成系遺伝子を強化してもよい。グルタミ
ン酸生合成系遺伝子を強化した例としては、解糖系のホスフォフルクト
35 キナーゼ (P F K、特開昭63-102692号)、アナブレロティッ

ク経路のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC、特公平7-83714号、特開昭62-55089号)、TCA回路のクエン酸合成酵素 (CS、特開昭62-201585号、特開昭63-119688号)、アコニット酸ヒドラターゼ (ACO、特開昭62-294086号)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICDH、特開昭62-166890号、特開昭63-214189号)、アミノ化反応としてはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH、特開昭61-268185号) 等がある。(iii) L-フェニルアラニン生産菌

- コリネホルム細菌のL-フェニルアラニン生産菌としては、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12637 (FERM BP-4160) (フランス特許出願公開第 2,686,898号参照) が、エシェリヒア・コリのL-フェニルアラニン生産菌としては、エシェリヒア・コリ AJ 12604 (FERM BP-3579) (欧州特許出願公開第 488,424号参照) が挙げられる。AJ 12604株は、*tyrA*-の宿主*E. coli*に、変異型*aroG*遺伝子を含むプラスミドと変異型*pheA*遺伝子を含むプラスミドが各々導入されて得られた形質転換株である (特開平5-344881号公報参照)。AJ12604株は、平成3年1月28日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に、受託番号 FERM P-11975として寄託されており、平成3年9月26日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、FERM BP-3579として寄託されている。

実施例

- 25 以下に、本発明の実施例を、本発明に好適に用いられる遺伝子及び宿主微生物の調製例と共に示して、本発明をさらに具体的に説明する。

(実施例1) *dtSR* 遺伝子を利用したL-グルタミン酸生産菌の創製及びそれを用いたL-グルタミン酸の製造

<1> *dtSR* 遺伝子を含む温度感受性プラスミドの作製

- 30 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869株由来の *dtSR* 遺伝子を含むプラスミド pDTR6 (W095/34672号国際公開パンフレット) を保持するエシェリヒア・コリ JM109/pDTR6 (プライベートナンバー AJ 12967; 受託番号 FERM BP-4994) から、前記プラスミドを回収した。尚、pDTR6は、
35 エシェリヒア・コリとコリネバクテリウム属細菌の双方の菌体内で自律

複製可能なプラスミド pSAC4 をベクターとする組換えプラスミドであり、クロラムフェニコール耐性マーカーを有している。また、pDTR6 を、界面活性剤に対する感受性が上昇したコリネ型細菌変異株 *プレバクテリウム・ラクトファーマンタム* AJ11060 株に導入して得られた形質転換株は、界面活性剤（ポリオキシエチレンソルビタンモノ

5 パルミテート）に対する耐性が上昇した。

pDTR6 を制限酵素 KpnI 及び XbaI で切断し、dtsR 遺伝子を含む DNA 断片を取得した。この DNA 断片と、KpnI 及び XbaI で切断したプラスミド pHSG398（宝酒造（株）製）とを、T4 DNA リガーゼを用いて連結し、pHSGX-K を作製した。pHSGX-K は、エシェリヒア・コリの菌体内で自律複製可能である。

10

上記のようにして得られた pHSGX-K の KpnI 部位に、コリネ型細菌由来の温度感受性複製起点（以下、「TSori」という）を導入した。TSori を含む DNA 断片は、TSori を有するプラスミド pHSC4 を BamHI 及び KpnI で切断し、得られた DNA 断片の両末端を宝酒造（株）製 Blunting kit を用い平滑化し、KpnI リンカー（宝酒造社製）を結合させた後自己結合させて得たプラスミド pKCT4 を KpnI で切断することによった得た。この DNA 断片を pHSGX-K の KpnI 部位に挿入して、pKCTX-K を得た。pHSC4 を BamHI 及び KpnI で切断し、得られた DNA 断片の両末端を平滑化した後、KpnI 部位を付加したものを、直接 pHSGX-K の KpnI 部位に挿入することによっても、pKCTX-K と同じ構造を有するプラスミドが得られる。

15

20

<2> dtsR 遺伝子破壊株の作製

dtsR 遺伝子破壊株は、温度感受性プラスミドを用いた相同組換え法により取得した。

25

まず、遺伝子破壊に用いる欠失型 dtsR 遺伝子を作製した。dtsR 遺伝子内には配列表配列番号 1 の 766 番目と 1366 番目の 2 箇所に Eco52I で消化される部位が存在する。そこで、pHSGX-K を Eco52I で完全消化した後自己結合させ、Eco52I 断片の 600 塩基対を欠失した dtsR 遺伝子を含むプラスミド pHSGX-KΔE を作製した。すなわち、pHSGX-KΔE 上の dtsR 遺伝子は中央部分をインフレームで欠失した構造になっている。

30

pHSGX-KΔE に含まれる dtsR 遺伝子が機能しないことは、次のようにして確認した。コリネ型細菌内で自律複製可能なプラスミド

35

- p H M 1 5 1 9 (K. Miwa et.al., Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) 由来の複製起点 (特公平 7-108228 号公報) を p H S G X-K Δ E 上にただ一つ存在する K p n I 切断部位に導入した。具体的には、p H M 1 5 1 9 を制限酵素 B a m H I 及び K p n I で
- 5 消化し、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片を宝酒造 (株) 製 Blunting kit を用い平滑末端化した後、K p n I リンカー (宝酒造 (株) 製) を用いて p H S G X-K Δ E の K p n I 部位に挿入し、p K C X-K Δ E を取得した。また、対照として p H S G 3 9 9 (Takeshita, S. et al.; Gene(1987), 61, 63-74 参照、宝酒造 (株) から
- 10 購入できる) を用い、その S a l I 部位に同様に S a l I リンカー (宝酒造 (株) 製) を用い p H M 1 5 1 9 の複製起点を挿入した p S A C 4 も作製した。p K C X-K Δ E と p S A C 4 とを上記の電気パルス法を用いてそれぞれ、界面活性剤に対する感受性が上昇したコリネ型細菌変異株ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム A J 1 1 0 6 0 株に導
- 15 入し、界面活性剤に対する耐性度をそれぞれ調べた。方法としては、M-C M 2 G 液体培地にポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテートを 0 ~ 1 0 m g / d l 添加しそれぞれの生育度を調べた。その結果、この欠失型 d t s R 遺伝子は界面活性剤に対する耐性を付与する機能を失っていた。
- 20 次に、p H S G X-K Δ E の K p n I 切断部位に、p K C T 4 を K p n I で切断して得られる T S o r i を含む D N A 断片を挿入し、プラスミド p K T C X-K Δ E を作製した。この p K T C X-K Δ E を野生株であるブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム A T C C 1 3 8 6 9 に電気パルス法を用いて導入し、特公平 7-108228 号公報記載の方法
- 25 で染色体上の d t s R 遺伝子を欠損型に置換した。具体的には A T C C 1 3 8 6 9 / p K T C X-K Δ E を 5 0 μ g / m l のオレイン酸を含む M-C M 2 G 液体培地で 2 5 ° C にて 6 時間振とう培養した後、5 μ g / m l のクロラムフェニコール及び 5 0 μ g / m l のオレイン酸を含む M-C M 2 G 培地上に撒き、3 4 ° C でコロニーを形成した株をプラスミ
- 30 ド組み込み株として取得した。次にこの株から 3 4 ° C でクロラムフェニコールに対して感受性になった株をレプリカ法により取得した。この感受性株の染色体を常法により取得し、サザンハイブリダイゼーション法により染色体上の d t s R 遺伝子の構造を調べ、d t s R 遺伝子が欠失型に置換されていることを確認し Δ E 株と命名した。d t s R 遺伝子の
- 35 取得及び d t s R 遺伝子破壊株の作製については、WO95/23224 号国際公

開パンフレットに詳述されている。

ΔE株は、高いL-グルタミン酸生産能を示したが、オレイン酸要求性を示し、オレイン酸を含まない培地では生育できなかった。

<3> d t s R 遺伝子を含む温度感受性プラスミドを保持する d t s R

5 遺伝子破壊株の作製

ΔE株に、完全長の d t s R 遺伝子を含む温度感受性プラスミド p K C T X - K を、電気パルス法により導入し、ΔE / p K C T X - K 株を得た。その際、培養は、p K C T X - K が細胞中に保持されるように、25℃で行った。

10 <4> L-グルタミン酸の製造

次に、ΔE株及びΔE / p K C T X - K 株の生育及びL-グルタミン酸生産性を比較した。種培養及び本培養は、500ml 容ガラス製ジャーファーマンターに300ml ずつ分注し、加熱殺菌した培地を用いた。培地の成分を表1に示す。培地のpHをアンモニアガスを用いて

15 7.3に維持した。通気量は、2/1~1/1 VVMとし、800~1300 rpmで攪拌した。種培養は表2に示す培養温度で13~14時間、本培養は表3に示す培養温度で35時間行った。本培養中は、50 g/Lのグルコース水溶液を50~100ml フィードした。また、ΔE株の培養には、オレイン酸誘導体としてTwee n 80 (ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート) を1 mg/ml 添加した。

20 培養後の培養液を51倍希釈した液の620nmでの吸光度 (OD620)、L-グルタミン酸 (glu) の蓄積量 (濃度 (g/dl)) 及び培養時間を表2及び表3に示す。

表 1

培地成分	種培養	本培養
グルコース (g/L)	6. 0	6. 0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0. 1 5	0. 1 5
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0. 1	0. 1 5
FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0. 0 0 1	0. 0 0 1 5
MnSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0. 0 0 1	0. 0 0 1 5
豆濃 *1) (ml/L)	0. 3 6	0. 1
ビオチン (mg/L)	0. 4 5	0. 5
ビタミンB ₁ (mg/L)	0. 4 5	0. 2

*1) : 大豆蛋白酸加水分解物(総窒素3.49g/100mLのものを使用)

表 2

菌株	培養温度 (℃)	Tween80 *1)	OD ₆₂₀	gluの蓄 積(g/dl)	培養時 間 (h)
A	3 2	無添加	2.00	0.2	13.5
B	25→34 *2)	無添加	1.68	0.9	16.0
C	3 1. 5	添加	0.46	3.3	40.0
D	3 1. 5	無添加	— *3)	—	—

*1) : Tween 80 (1 mg/ml) の添加の有無を示す

*2) : 25℃で10時間培養後に34℃に温度シフトしたことを示す

*3) : 生育しなかったことを示す

表 3

5	種培養 *1)	培養温度(℃)	Tween80 *1)	gluの蓄積(g/dl)
	A	37	無添加	8.6
	B	37	無添加	9.0
10	C	34	添加	3.9

*1) : Tween80 (1 mg/ml) の添加の有無を示す

*2) : 表 2 に示す種培養で得られた菌体を用いたことを示す

15

以上の結果から、 $\Delta E/pKCTX-K$ 株は ΔE 株に比べて、種培養では γ -グルタミン酸の生成量は少ないが生育がよく、本培養では γ -グルタミン酸生成量が多いことが明らかである。つまり、 $\Delta E/pKCTX-K$ は、低温培養条件下ではプラスミド上の $dtsR$ 遺伝子が機能するために生育がよく、高温培養条件下では $dtsR$ 遺伝子が脱落するので γ -グルタミン酸が効率よく生成される。

20

(実施例 2) HD 遺伝子を利用した γ -リジン生産菌の創製及びそれを用いた γ -リジンの製造

<1> HD 遺伝子を含む温度感受性プラスミドの作製

25 (1) コリネ型細菌の HD 遺伝子の単離

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12036株 (FERM BP-734) から、次のようにして HD 遺伝子を単離した。

HD 遺伝子の塩基配列は、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて報告されており (Peoples, O. P. et al; Molecular Microbiology 30 2(1) 63-72 (1988))、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムとコリネバクテリウム・グルタミカムの各々の HD 遺伝子の配列は類似性が高いことが予想されたので、コリネバクテリウム・グルタミカムの配列を基に PCR 法に用いる合成プライマー DNA を作製した。

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12036株から染色体 DNA を調製した。この染色体 DNA から HD 遺伝子を含む約 1500bp の D 35

NA断片をPCR法により増幅するために、ABI社製DNA合成機 model381A型を用いて、5'側プライマーH1

(841) 5'-CTGGGAAGGTGAATCGAATT-3' (860) : 配列表配列番号5) 及び3'

側プライマーH2 ((2410) 5'-TCCGAGGTTTGCAGAAGATC-3' (2391) : 配列表

5 配列番号6) の2種類のプライマーを合成した。尚、かっこ内の数字は Peoplesらが発表した塩基配列 (Peoples, O. P. et al., Molecular Microbiology 2(1) 63-72 (1988)) における位置を示す。得られた合成プライマーは、逆相HPLCにて精製した。

PCR反応は、PCR増幅装置 (DNAサーマルサイクラーPJ2000 :
10 宝酒造 (株)) 及びPCRキット (Takara GeneAmp™ kit : 宝酒造 (株)) を用い、表4に示す組成で行った。

表 4

成分	濃度	配合量
プライマーH1	0.25 μ M	25pmol
プライマーH2	0.25 μ M	25pmol
dATP, dGTP, dTTP, dCTP	各々200 μ M	20nmol
Taq DNA ポリメラーゼ	2.5U/100 μ L	0.5 μ L (5U/ μ L)
染色体DNA		1 μ g
10 \times 反応緩衝液		10 μ L
水		バランス (合計量が100 μ L)

PCR反応におけるDNAの変性、DNAのアニーリング、及びポリ
メラーゼ反応の条件は、各々94℃、1分、37℃、2分、75℃、3分とし、
各温度間の遷移は1秒で行った。この反応サイクルを25サイクル繰返す
30 ことによりDNAの増幅を行った。こうして得られた増幅反応生成物の
大きさをアガロースゲル電気泳動により確認した結果、約1.4KbpのDN
A断片の増幅が認められた。

こうして得られた増幅断片をKpnIで切断して得られるDNA断片
を、ベクタープラスミドpHSG399 (Takeshita, S. et al.; Gene(1987), 6
35 1, 63-74参照、宝酒造 (株) 製から購入できる) のKpnI部位に挿入して

組換えプラスミドをpHDWと命名し、このプラスミドをE. coli JM109株に導入して形質転換体を得た。

- こうして得られたブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12036株のHD遺伝子断片の塩基配列の決定をダイデオキシ法により
5 行った。決定された塩基配列及び推定されるアミノ酸配列を配列表配列番号3及び4に示す。

(2) HD遺伝子の温度感受性プラスミドへの導入

- HD遺伝子を含むプラスミドpHDWをKpnIで消化してHD遺伝子断片を切り出し、これをKpnIで消化したpHSG399（宝酒造
10 (株)製)にT4DNAリガーゼを用いて連結し、プラスミドpHDWを得た。

- 上記のようにして得られたpHDWのBamHI部位に、TSoriを導入した。TSoriを含むDNA断片は、pHSC4をBamHI及びKpnIで切断することによって得た。このDNA断片の両末端を平滑末端
15 化した後、BamHI部位を付加したものを、pHDWのBamHI部位に挿入し、pTSHDを得た。

<2>HD遺伝子破壊株の作製

HD遺伝子破壊株を、温度感受性プラスミドを用いた相同組換え法により取得した。

- 20 まず、遺伝子破壊に用いる欠失型HD遺伝子を作製した。野生型HD遺伝子を有するプラスミドpHDWをAatIIで切断した後自己連結し、HD遺伝子内に存在する2つのAatII部位（配列番号3において塩基番号716～721、1082～1087）間を欠失させることにより一部を欠失したHD遺伝子（HD-Δ遺伝子）を含むプラスミドを作製した。このプラスミ
25 ドをKpnIで切断してHD-Δ遺伝子断片を得、これをpHSG398のKpnI部位に挿入し、さらにTSoriを有するDNA断片をBamHI部位に挿入することにより、HD-Δ遺伝子置換用プラスミドpTSHDΔを構築した。TSoriを有するDNA断片は、pHSC4を制限酵素KpnIにて切断して得られるDNA断片の両末端をDNA Blunting kit（宝酒
30 造（株）製）で平滑末端化した後、BamHIリンカー（宝酒造（株）製）を接続することにより、BamHIのみによる切断によって切り出される様改変したプラスミドから調製した。

- 上記で得られた欠失型HD遺伝子置換用プラスミドpTSHDΔを用いて、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ11446株の形質転換を、
35 電気パルス法（杉本ら、特開平2-207791号公報）によって行った。尚、

AJ11446株は、特公昭62-24073に記載されるレーリジン生産菌であり、1979年8月23日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にFERM P-5163の受託番号で寄託されている。

- 5 得られた形質転換株を、M-CM2G培地を用いて25℃にてフルグロース（約 $1\sim 2 \times 10^9/\text{ml}$ ）になるまで培養した。培養菌体を、プレート1枚あたり105細胞となるよう希釈し、クロラムフェニコール（ $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を含むM-CM2G平板培地にまき、34℃にて2～7日培養してコロニーを取得した。得られたコロニーについて、細胞中にプラスミドが含まれていない
- 10 ことを確認し、さらに直鎖状のpHSG398をプローブに用いたサザン・ハイブリダイゼーション解析により、遺伝子置換用プラスミドの染色体への組込みを確認した。

- 次に、欠失型HD遺伝子のみを染色体に残すために、野生型HD遺伝子及びベクターを染色体DNAから脱落させて、変異型HD遺伝子置換株及び欠失型HD遺伝子置換株を得た。野生型HD遺伝子及びベクター
- 15 の脱落は次のようにして行った。

- 各組込み株を、クロラムフェニコール（ $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を含むM-CM2G培地で34℃にてフルグロース（ $1\sim 2 \times 10^9/\text{ml}$ ）になるまで培養した。培養菌体を、クロラムフェニコールを含まないM-CM2G平板培地に1枚あたり
- 20 $50\sim 200$ コロニーとなるようにまき、34℃にて培養した。生育したコロニーを、クロラムフェニコール（ $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を含むM-CM2G平板培地にレブリカし、34℃にて培養してクロラムフェニコール感受性株を取得した。得られたクロラムフェニコール感受性株の染色体からベクターが脱落していることを、サザン・ハイブリダイゼーションにより確認し、さらに
- 25 欠失型HDを発現していることを確認した。また、得られた株がメチオニン要求性及びスレオニン要求性を示すことを確認した。こうして得られた遺伝子破壊株をHD Δ 株と命名した。HD Δ 株の染色体DNAの塩基配列決定により、遺伝子が欠失型であることを確認した。

- <3> HD遺伝子を含む温度感受性プラスミドを保持するHD遺伝子破壊株の作製
- 30

HD Δ 株に、完全長のHD遺伝子を含む温度感受性プラスミドpTSHDを、電気パルス法により導入し、HD Δ /pTSHD株を得た。その際、培養は、pTSHDが細胞中に保持されるように、25℃で行った。

- 35 <4> レーリジンの製造

次に、HDΔ株及びHDΔ/pTSHD株の生育及びレーリジン生産性を比較した。種培養及び本培養は、500ml容ガラス製ジャーファーマンターに300mlずつ分注し、加熱殺菌した培地を用いた。培地の成分を表5に示す。培地のpHをアンモニアガスを用いて7.3に維持した。通気量は、2/1~1/1VVMとし、800~1300rpmで攪拌した。種培養は表5に示す培養温度で15~25時間、本培養は表6に示す培養温度で30時間行った。また、HDΔ株の培養にレーメチオニン及びリースレオニンを添加する場合には、各々70mg/dl添加した。比較のため、親株であるAJ11446についても同様に培養を行った。

培養後の培養液を51倍希釈した液の620nmでの吸光度(OD620)、レーリジン(lys)の蓄積量(濃度(g/dl))及び培養時間を表6及び表7に示す。

表 5

培地成分	種培養	本培養
グルコース (g/L)	5.0	15.0
NH ₂ SO ₄ (g/L)	2.5	7.5
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.1	0.1
FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.001	0.001
MnSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.001	0.001
豆濃 *1) (ml/L)	3.0	3.0
ビオチン (mg/L)	0.45	0.45
ニコチンアミド (mg/L)	0.5	0.5
ビタミンB ₁ (mg/L)	0.2	0.2

*1) : 大豆蛋白酸加水分解物(総窒素3.49g/100mLのものを使用)

表 6

	菌株		培養温度 (℃)	Met + Thr *1)	OD ₆₂₀	lysの蓄積 (g/dl)
5	E	HDΔ/pTSHD	3 2	無添加	0.82	1.7
	F		25→34 *2)	無添加	0.75	1.8
10	G	HDΔ	3 2	添加	0.65	2.0
	H		3 2	無添加	— *3)	—
15	I	AJ11446	3 2	無添加	0.81	1.6

*1) : L-メチオニン及びL-スレオニン (70mg/mlづつ) の添加の有無を示す

*2) : 25℃で10時間培養後に34℃に温度シフトしたことを示す

20 *3) : 生育しなかったことを示す

表 7

25	種培養 *2)	培養温度(℃)	Met + Thr *1)	lysの蓄積 (g/dl)
	E	3 4	—	6. 8
30	F	3 4	—	7. 2
	G	3 4	+	6. 2
	I	3 4	—	5. 9

*1) : L-メチオニン及びL-スレオニン (70mg/mlづつ) の添加の有無を示す

35 *2) : 表 2 に示す種培養で得られた菌体を用いたことを示す

以上の結果から、 $HD\Delta/pTSHD$ 株は $HD\Delta$ 株に比べて、種培養では γ -リジンの生成量は少ないが生育がよく、本培養では γ -リジン生成量が多いことが明らかである。

(実施例3) α -KGDH遺伝子を利用した γ -グルタミン酸生産菌の創製及びそれを用いた γ -グルタミン酸の製造

<1> α -KGDH遺伝子を含む温度感受性プラスミドの作製

(1) α -KGDH遺伝子の単離

(i) プローブの調製

大腸菌と枯草菌の α -KGDH・E1サブユニット遺伝子間で相同性の高い領域を選び、配列表配列番号9及び10に示すオリゴヌクレオチドをホスホアミダイド法によりDNA合成装置（アプライドバイオシステム社製モデル394）を用いて合成した。

プライマーとして該オリゴヌクレオチド0.25 μ mol、鋳型として常法によって調製したパチルス・ズブチリス NA64（同株はパチルス・ジェネテック・ストック・センター（米国オハイオ州立大学）より入手した）の染色体DNA0.1 μ g及びタックDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、塩化カリウム50mM、塩化マグネシウム1.5mM及びゼラチン0.0001%を含有する10mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.3）0.1mlに添加し、94℃を1分、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを30回繰り返すPCR法を行った。反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、目的とするDNA断片をガラスパウダー（宝酒造社製）を用いて回収した。このDNA断片をクレノウフラグメント（アマシャム社製）と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ （アマシャム社製）を用いたラベル化の常法に従って標識し、プローブとして用いた。

(ii) プレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869の染色体DNA断片の調製

バクト・トリプトン（ディフコ社製）1%、バクト・イーストエキストラクト（ディフコ社製）0.5%及び塩化ナトリウム0.5%から成るT-Y培地（pH7.2）500mlに、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869を接種し、31.5℃で6時間培養し培養物を得た。この培養物を5,000rpmで10分間遠心分離処理し沈澱物として湿菌体2gを得た。

該菌体から斉藤、三浦の方法（Biochem. Biophys. Acta., 72, 619, (1963)）により染色体DNAを抽出した。この染色体DNA2 μ g及び

- 制限酵素 *EcoRI* 200 ユニットを 10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含有する 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) におのおの混合し、温度 37°C で 15 時間反応させた。反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、
- 5 エタノール沈澱処理して *EcoRI* で消化された *ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム* ATCC 13869 の染色体 DNA 断片を得た。
(iii) *ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム* ATCC 13869 の α -KGDH 遺伝子の単離
- プラスミドベクター pUC18 (宝酒造社製) 1 μ g 及び制限酵素 *EcoRI* 20 ユニットを 10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含有する 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に混合し、温度 37°C で 2 時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱した。この後、プラスミドベクター由来の DNA 断片が再結合するのを防止する
- 15 ため、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pl.60 (1989)) の方法でバクテリアル・アルカリフォスファターゼ処理により DNA 断片の脱リン酸化を行い、常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。
- 20 この *EcoRI* で消化された pUC18 を 0.1 μ g、(ii) で得られた *EcoRI* で消化された *ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム* ATCC 13869 の染色体 DNA 断片 1 μ g 及び T4 DNA リガーゼ 1 ユニット (宝酒造社製) を 6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール及び 10 mM アデノシン三リン酸を含有する 6
- 25 6 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に添加し、温度 16°C で 8 時間反応し、DNA を連結させた。次いで該 DNA 混合物で、常法により *エシェリヒア・コリ* JM109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを 100 μ g/ml のアンピシリンを含む L 寒天培地上にまき、約 10,000 個の形質転換体を得た。
- 30 得られた形質転換体から、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pl.90 (1989)) の方法により、(i) で得られたプローブ DNA とハイブリダイズする形質転換体を選択した。
(iv) *ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム* ATCC 1386
- 35 9 の α -KGDH 遺伝子の塩基配列の決定

(iii) により得られた形質転換体からMolecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pl.25(1989)) 記載のアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを調製した。該プラスミドDNAはブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869の染色体DNA由来の約6キロベースのDNA断片を含んでいた。該プラスミドを (iii) の反応組成で制限酵素EcoRI及びXhoIで切断し、常法に従いアガロースゲル電気泳動を行い、(iii)と同様にしてサザンハイブリダイゼーションを行いプローブDNAとハイブリダイズする断片を同定した。その結果、EcoRI及びXhoIに切断された約3キロベースの切断断片がハイブリダイズすることが判明した。該DNA断片を (iii) で行ったようにEcoRI及びXhoIで切断したプラスミドベクターpHSG397 (宝酒造社製) に連結しクローン化した。得られたプラスミドDNAを用いて該DNA断片の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオケミカル社製) を用いSangerの方法 (J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)) に従って行った。

得られたDNA断片は完全なオープン・リーディング・フレームを含んでいなかったため、(iii) で行ったようにブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869の染色体DNAをXhoIで切断しpHSG397に連結した組換え体プラスミドで形質転換を行い、(ii) で得られたブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869の染色体DNA由来の約3キロベースのEcoRI、XhoI切断断片を (i) の方法に従いラベル化したものをプローブとしてハイブリダイズする形質転換体を選択した。得られた形質転換体の有するプラスミドは約9キロベースのDNA断片を含んでいた。このDNA断片を含む遺伝子の制限酵素地図を図2に示した。該プラスミドを (iii) の反応組成で制限酵素SalI及びXhoIで切断し、常法に従いアガロースゲル電気泳動を行い (iii) の方法によりハイブリダイズする断片を同定した結果、約4.4キロベースの断片であることが判明した。該DNA断片を (iii) で行ったようにSalI及びXhoIで切断したプラスミドベクターpHSG397に連結しクローン化した。このプラスミドをpHSGS-Xと命名した。該プラスミドが含むSalI及びXhoI切断断片中SalI切断点からEcoRI切断点までの約1.4キロベースのDNA断片の塩基配列の決定を上記と同様にし

て行った。

こうして得られた S a l I 及び X h o I 切断遺伝子断片の塩基配列は配列表配列番号 7 に示す通りである。オープン・リーディング・フレームを推定し、その塩基配列より推定される産物のアミノ酸配列を配列表
5 配列番号 7 及び配列番号 8 に示した。すなわち、配列表配列番号 8 示されるアミノ酸配列から成る蛋白質をコードする遺伝子が、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 の α -KGDH 遺伝子である。なお、蛋白質の N 末端にあるメチオニン残基は開始コドンである A T G に由来するため蛋白質本来の機能とは無関係であることが
10 多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記蛋白質の場合にもメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。

塩基配列、アミノ酸配列おのおのについて既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースは E M B L 及び S W I S S - P R O T である。その結果、配列表配列番号 7 に示される DNA 及びそれにコード
15 される蛋白質は、既に報告済みの大腸菌及び枯草菌の α -KGDH・E 1 サブユニット遺伝子等と相同性を持つ蛋白質であることが判明した。

本遺伝子のコードする蛋白質は、N 末端のメチオニン残基を含めて 1, 257 個のアミノ酸から成り、既に報告のある α -KGDH とは大きく
20 異なる特徴を有していた。すなわち、C 末端側の約 900 アミノ酸は種々の E 1 サブユニットと高い相同性を示したが、N 末端側の 300 アミノ酸は他種 α -KGDH には見られないものであり、本蛋白質が特殊な機能を持つことを示唆するものである。この N 末端側 300 アミノ酸部分を既知の配列との相同性比較を行うと大腸菌やアゾトバクター属細菌
25 の E 2 サブユニットとの相同性が認められた。これは、本蛋白質が他種 α -KGDH とは異なり、E 1、E 2 両方の活性を持つ可能性を示唆するものである。

また、本遺伝子オープン・リーディング・フレーム上流には大腸菌に見られるプロモーター共通配列に類似した配列 (281-286 及び 307-312)
30 及びコリネ型細菌のリボソーム結合配列と類似した配列 (422-428) が見いだされた。本遺伝子オープン・リーディング・フレーム下流には、転写の終結シグナルと類似したステム&ループ構造 (4243-4281) がみられた。これらの配列は本遺伝子が独立して転写、翻訳を受けており、
他種 α -KGDH とは異なった遺伝子構造を持っていることを示唆する
35 ものである。

(2) α -KGDH遺伝子の温度感受性プラスミドへの導入

上記のようにして得られたpHSGS-Xを制限酵素BamHI及びSalIで切断し、 α -KGDH遺伝子を含むDNA断片を得た。このDNA断片と、BamHI及びSalIで切断したプラスミドpHSG299（宝酒造（株）製）とをT4DNAリガーゼを用いて連結し、pHSGS-X'を作製した。

pHSGS-X'のBamHI部位に、コリネ型細菌由来のTSoriを導入した。TSoriを含むDNA断片は、pHSC4をBamHI及びKpnIで切断し、得られたDNA断片の両末端を平滑末端化した後、BamHIリンカーを結合させて得たプラスミドpTBCT4をBamHIで切断することによって得た。このDNA断片をpHSGS-X'のBamHI部位に挿入してプラスミドpBKTS-Xを得た。

<2> α -KGDH遺伝子欠損株の作製

α -KGDH遺伝子破壊株は、温度感受性プラスミドを用いた相同組換え法により取得した。具体的には、 α -KGDH遺伝子内には配列表配列番号7の1340番目と3266番目の2箇所にKpnIで消化される部位が存在する。そこで、上記で得られたpHSGS-XをKpnIで部分消化したのち自己結合させ、KpnI断片の1926塩基対を欠失したプラスミドpHSGS-X Δ Kを作製した。pHSGS-X Δ K上の α -KGDH遺伝子は中央部分を欠失した構造になっている。次にpHSGS-X Δ KのBamHI認識部位に、TSoriを導入し、プラスミドpBTS-X Δ Kを作製した。具体的には、pHSC4を制限酵素KpnIで消化し、DNA平滑末端化キット（宝酒造社製、Blunting kit）を用い平滑末端化した後、BamHIリンカー（宝酒造社製）を結合させた後自己結合させて得たプラスミドを制限酵素BamHIで消化し、TSoriを含む遺伝子断片を取得し、これをpHSGS-X Δ KのBamHI部位に挿入しプラスミドpBTS-X Δ Kを取得した。

このプラスミドをコリネ型L-グルタミン酸生産菌の野生株であるブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869に電気パルス法（特開平2-207791号）を用いて導入し、染色体上の α -KGDH遺伝子を欠失型に置換した。

具体的には、プラスミドが導入されたATCC13869/pBTS-X Δ KをCM2G（ポリペプトン1%、酵母エキス1%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース0.5%、pH7.2）液体培地で25℃にて6時間振とう培養した後、5 μ g/mlのクロラムフェニコールを含

- むCM2G寒天培地上に撒き、34℃で培養して形成したコロニーをプラスミド組み込み株として取得した。次に、この株から34℃でクロラムフェニコールに対して感受性になった株をレプリカ法により取得した。この感受性株から染色体上の α -KGDH遺伝子の塩基配列を調べ、 α -KGDH遺伝子が欠失型に置換されていることを確認し、これを ΔS 株と命名した。 ΔS 株の α -KGDH活性を測定したところ、活性は全く検出されなかった。
- <3> α -KGDH遺伝子を含む温度感受性プラスミドを保持する α -KGDH遺伝子破壊株の作製
- 10 ΔS 株に、完全長の α -KGDH遺伝子を含む温度感受性プラスミドpBKTS-Xを電気パルス法により導入し、 $\Delta S/pBKTS-X$ 株を得た。その際、培養は、pBKTS-Xが細胞中に保持されるように、25℃で行った。
- <4> L-グルタミン酸の製造
- 15 ΔS 株と $\Delta S/pBKTS-X$ 株の生育及びL-グルタミン酸生産性を比較した。種培養及び本培養は、坂口フラスコに20mlずつ分注し、加熱殺菌した培地を用いた。培地の成分を表8に示す。種培養は表9に示す培養温度で残糖がなくなるまで、本培養は表9に示す培養温度で23時間、振盪して行った。
- 20 培養後の培養液を51倍希釈した液の620nmでの吸光度(OD620)、L-グルタミン酸(glu)の蓄積量(濃度(g/dl))、残糖量(g/dl)を表9に示す。

表 8

培地成分	配合量
グルコース (g/L)	3. 0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0. 1 5
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0. 1
FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0. 0 0 1
MnSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0. 0 0 1
豆濃 *1) (ml/L)	0. 4 8
ビオチン (mg/L)	0. 3
ビタミンB ₁ (mg/L)	0. 2
1Mリン酸カルシウム緩衝液 (pH7.5) (ml)	2. 0

*1) : 大豆蛋白酸加水分解物 (総窒素3.49g/100mLのものを使用)

表 9

菌 株	培養温度 (℃)		OD ₆₂₀	gluの蓄積 (g/dl)	残糖 (g/dl)
	種培養	本培養			
ΔS/pBKTS-X	2 5	2 5	1.024	0.00	0.0
	25→35 *1)	3 5	0.621	1.14	0.0
ΔS	2 5	2 5	0.063	0.29	2.7
	25→35 *1)	3 5	0.074	0.37	2.3

*1) : 2 5℃で7時間培養後に3 5℃に温度シフトしたことを示す

以上の結果から、ΔS/pBKTS-X株はΔS株に比べて、2 5℃
35 での生育が非常によく、本培養では、L-グルタミン酸生成量が多いこ

とが明らかである。つまり、 $\Delta S/pBKTS-X$ 株は、低温培養条件では、プラスミド上の $\alpha-KGDH$ 遺伝子遺伝子が機能するために生育がよく、高温条件下では $\alpha-KGDH$ 欠損株となり、L-グルタミン酸が効率よく生成される。

5

産業上の利用可能性

本発明の微生物は、目的物質の産生に不利に作用する遺伝子であって、特に微生物の生育にとっては有利に作用する遺伝子の、染色体外での保持及び脱落を制御することができる。本発明の微生物を目的物質の発酵
10 生産に用いることによって、目的物質を効率よく製造することができる。

配列表

出願人氏名又は名称：味の素株式会社、桑原陽子、木村英一郎、河原義雄、中松亘

15 発明の名称：発酵法による目的物質の製造法

整理番号：B-318

出願日：平成9年6月4日

優先権番号：特許願平成8年155575号

優先日：平成8年6月17日

20 配列の数：10

配列番号：1

配列の長さ：2855

配列の型：核酸

25 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：GenomicDNA

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

30 存在位置：359..1987

配列

GA	TC	TG	GAA	CT	GAC	AG	TT	TTC	AC	CG	TTC	AG	TT	TG	GAG	C	GCT	GAG	CT	GCA	AG	CT	CCA	60						
GCA	AG	TC	CAG	C	ATT	AG	TG	GAG	CCT	GT	CAC	TT	TTT	CG	TAA	AAT	GAC	CT	GG	CCA	AAG	TC	AC	CGT	120					
TTT	GG	AG	C	AA	TTT	TC	C	TTC	AGG	AG	CT	C	AA	CG	TT	TAG	CGG	CT	CT	CT	GG	AT	CG	TG	AA	AT	GT	180		
CA	AC	GT	T	CAT	GG	A	G	C	CA	T	GT	AG	T	G	G	G	T	CG	CG	T	G	A	A	A	G	G	G	G	CA	240

	CGCCCCAAAAA	GTTTTACCTT	TAAAAACTAC	CCGCACGCAG	CACGAACCTG	TTCAAGTGATG	300
	TAAATCACCG	CGGAAATATT	GTGGACGTAA	CCCCCGCCTA	CGCTACGAT	TTCAAAAC	358
	ATG ACC ATT	TCC TCA	CCT TTG	ATT GAC	GTC GCC	AAC CTT	406
	Met Thr	Ile Ser	Ser Pro	Leu Ile	Asp Val	Ala Asn	Leu Pro
5	1	5	10	15			
	AAC ACC	ACT GCC	GGC AAG	ATC GCC	GAC CTT	AAG GCT	454
	Asn Thr	Thr Ala	Gly Lys	Ile Ala	Asp Leu	Lys Ala	Arg Ala
		20	25	30			
	GCC CAT	TTC CCC	ATG GGT	GAA AAG	GCA GTA	GAG AAG	502
10	Ala His	Phe Pro	Met Gly	Glu Lys	Ala Val	Glu Lys	Val His
		35	40	45			
	GGA CGC	CTC ACT	GCC CGT	GAG CGC	TTG GAT	TAC TTA	550
	Gly Arg	Leu Thr	Ala Arg	Glu Arg	Leu Asp	Tyr Leu	Leu Asp
		50	55	60			
15	TCC TTC	ATC GAG	ACC GAT	CAG CTG	GCT CGC	CAC CGC	598
	Ser Phe	Ile Glu	Thr Asp	Gln Leu	Ala Arg	His Arg	Thr Thr
		65	70	75	80		
	GGC CTG	GGC GCT	AAG CGT	CCT GCA	ACC GAC	GGC ATC	646
	Gly Leu	Gly Ala	Lys Arg	Pro Ala	Thr Asp	Gly Ile	Val Thr
20		85	90	95			
	GGC ACC	ATT GAT	GGA CGC	GAA GTC	TGC ATC	TTC TCG	694
	Gly Thr	Ile Asp	Gly Arg	Glu Val	Cys Ile	Phe Ser	Gln Asp
		100	105	110			
	GTA TTC	GGT GGC	GCG CTT	GGT GAG	GTG TAC	GGC GAA	742
25	Val Phe	Gly Gly	Ala Leu	Gly Glu	Val Tyr	Gly Glu	Lys Met
		115	120	125			
	ATC ATG	GAG CTG	GCA ATC	GAC ACC	GGC CGC	CCA TTG	790
	Ile Met	Glu Leu	Ala Ile	Asp Thr	Gly Arg	Pro Leu	Ile Gly
		130	135	140			
30	GAA GGC	GCT GGC	GCT CGC	ATT CAG	GAC GGC	GCT GTC	838
	Glu Gly	Ala Gly	Ala Arg	Ile Gln	Asp Gly	Ala Val	Ser Leu
		145	150	155	160		
	ATT TCC	CAG ACC	TTC TAC	CAA AAC	ATT CAG	GCT TCT	886
	Ile Ser	Gln Thr	Phe Tyr	Gln Asn	Ile Gln	Ala Ser	Gly Val
35		165	170	175			

	CAG ATC TCC GTC ATC ATG GGC GCA TGT GCA GGT GGC AAC GCT TAC GGC	934
	Gln Ile Ser Val Ile Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Asn Ala Tyr Gly	
	180 185 190	
	CCA GCC CTG ACC GAC TTC GTG GTC ATG GTG GAC AAG ACC TCC AAG ATG	982
5	Pro Ala Leu Thr Asp Phe Val Val Met Val Asp Lys Thr Ser Lys Met	
	195 200 205	
	TTC GTT ACC GGC CCA GAC GTG ATC AAG ACC GTC ACC GGC GAG GAA ATC	1030
	Phe Val Thr Gly Pro Asp Val Ile Lys Thr Val Thr Gly Glu Glu Ile	
	210 215 220	
10	ACC CAG GAA GAG CTT GGC GGA GCA ACC ACC CAC ATG GTG ACC GCT GGC	1078
	Thr Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala Thr Thr His Met Val Thr Ala Gly	
	225 230 235 240	
	AAC TCC CAC TAC ACC GCT GCG ACC GAT GAG GAA GCA CTG GAT TGG GTA	1126
	Asn Ser His Tyr Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Ala Leu Asp Trp Val	
15	245 250 255	
	CAG GAC CTG GTG TCC TTC CTC CCA TCC AAC AAT CGC TCT TAC ACA CCA	1174
	Gln Asp Leu Val Ser Phe Leu Pro Ser Asn Asn Arg Ser Tyr Thr Pro	
	260 265 270	
	CTG GAA GAC TTC GAC GAG GAA GAA GGC GGC GTT GAA GAA AAC ATC ACC	1222
20	Leu Glu Asp Phe Asp Glu Glu Glu Gly Gly Val Glu Glu Asn Ile Thr	
	275 280 285	
	GCT GAC GAT CTG AAG CTC GAC GAG ATC ATC CCA GAT TCC GCG ACC GTT	1270
	Ala Asp Asp Leu Lys Leu Asp Glu Ile Ile Pro Asp Ser Ala Thr Val	
	290 295 300	
25	CCT TAC GAC GTC CGC GAT GTC ATC GAA TGC CTC ACC GAC GAT GGC GAA	1318
	Pro Tyr Asp Val Arg Asp Val Ile Glu Cys Leu Thr Asp Asp Gly Glu	
	305 310 315 320	
	TAC CTG GAA ATC CAG GCA GAC CGC GCA GAA AAC GTT GTT ATT GCA TTC	1366
	Tyr Leu Glu Ile Gln Ala Asp Arg Ala Glu Asn Val Val Ile Ala Phe	
30	325 330 335	
	GGC CGC ATC GAA GGC CAG TCC GTT GGA TTT GTT GCC AAC CAG CCA ACC	1414
	Gly Arg Ile Glu Gly Gln Ser Val Gly Phe Val Ala Asn Gln Pro Thr	
	340 345 350	
	CAG TTC GCT GGC TGC CTG GAC ATC GAC TCC TCT GAG AAG GCA GCT CGC	1462
35	Gln Phe Ala Gly Cys Leu Asp Ile Asp Ser Ser Glu Lys Ala Ala Arg	

	355	360	365	
	TTC GTC CGC ACC TGC GAC GCG TTT AAC ATC CCA ATC GTC ATG CTT GTC	1510		
	Phe Val Arg Thr Cys Asp Ala Phe Asn Ile Pro Ile Val Met Leu Val			
	370	375	380	
5	GAC GTC CCC GGC TTC CTT CCA GGC GCA GGC CAG GAG TAT GGT GGC ATC	1558		
	Asp Val Pro Gly Phe Leu Pro Gly Ala Gly Gln Glu Tyr Gly Gly Ile			
	385	390	395	400
	CTG CGT CGT GGC GCA AAG CTG CTC TAC GCA TAC GGC GAA GCA ACC GTT	1606		
	Leu Arg Arg Gly Ala Lys Leu Leu Tyr Ala Tyr Gly Glu Ala Thr Val			
10	405	410	415	
	CCA AAG ATT ACC GTC ACC ATG CGT AAG GCT TAC GGC GGA GCG TAC TGC	1654		
	Pro Lys Ile Thr Val Thr Met Arg Lys Ala Tyr Gly Gly Ala Tyr Cys			
	420	425	430	
	GTG ATG GGT TCC AAG GGC TTG GGC TCT GAC ATC AAC CTT GCA TGG CCA	1702		
15	Val Met Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ser Asp Ile Asn Leu Ala Trp Pro			
	435	440	445	
	ACC GCA CAG ATC GCC GTC ATG GGC GCT GCT GGC GCA GTC GGA TTC ATC	1750		
	Thr Ala Gln Ile Ala Val Met Gly Ala Ala Gly Ala Val Gly Phe Ile			
	450	455	460	
20	TAC CGC AAG GAG CTC ATG GCA GCT GAT GCC AAG GGC CTC GAT ACC GTA	1798		
	Tyr Arg Lys Glu Leu Met Ala Ala Asp Ala Lys Gly Leu Asp Thr Val			
	465	470	475	480
	GCT CTG GCT AAG TCC TTC GAG CGC GAG TAC GAA GAC CAC ATG CTC AAC	1846		
	Ala Leu Ala Lys Ser Phe Glu Arg Glu Tyr Glu Asp His Met Leu Asn			
25	485	490	495	
	CCG TAC CAC GCT GCA GAA CGT GGC CTG ATC GAC GGC GTG ATC CTG CCA	1894		
	Pro Tyr His Ala Ala Glu Arg Gly Leu Ile Asp Ala Val Ile Leu Pro			
	500	505	510	
	AGC GAA ACC CGC GGA CAG ATT TCC CGC AAC CTT CGC CTG CTC AAG CAC	1942		
30	Ser Glu Thr Arg Gly Gln Ile Ser Arg Asn Leu Arg Leu Leu Lys His			
	515	520	525	
	AAG AAC GTC ACT CGC CCT GCT CGC AAG CAC GGC AAC ATG CCA CTG	1987		
	Lys Asn Val Thr Arg Pro Ala Arg Lys His Gly Asn Met Pro Leu			
	530	535	540	
35	TAAATCGGCG AATCCATAAA GGTTCAAAG AATTCAATAA GGATTGATA AGGGTTCGAT	2047		

AAGGGTTGGA TAAGGGCCGA CTTAAATGAT TGGATGTAAA GAAATACCAA TGAAAATTGG 2107
 CAACTCTTTA CACCCATCT TTAAGACATG GGGGGTGGCG CTGGGCTAAT ATAACCGGTT 2167
 AGCGAAACGA TTAGTCCCTT GTTAGGGGGA TTAACCCCTG AAGTGGGTG TATTTTGGCG 2227
 TTTGTATGTT CACACAAGAA CCTGACACAA CGCCTTCAA GTACGTGAC CACGAACCAAG 2287
 5 CGCATATTTC ACTCTCAACC TTCAGGATTT AGACTAAGAA ACCATGACTG CAGCACAGAC 2347
 CAAACCTGAC CTCACCAACA CGGCTGGAAA GCTGTCCGAT CTTCGCTCCC GTCTTGACA 2407
 AGCTCAAGCT CCAATGGGCG AAGCAACTGT AGAAAAAGTG CACGCTGCTG GCAGGAAGAC 2467
 TGCCCGCGAA CGTATCGAGT ATTTGCTGTA TGAGGGCTCT TTCTAGAGA TCGATGCTCT 2527
 TGCTCGTAC CGTTCCAAGA ACTTCGGCCT GGATGCCAAG CGTCCAGCTA CTGACGGTGT 2587
 10 TGTGACTGGT TACGGCACCA TCGATGGCG TTAGGTCTGT GTGTCTCC AGGACGGGCG 2647
 TGTATCGGT GCGCTTTGG GTGAAGTTTA TGGTGAAGAG ATCGTAAAG TTATGGATCT 2707
 TCGATCAAG ACCGGTGTG CTTTGATCGG AATCAATGAG GGTGCTGGTG CGCGTATCCA 2767
 GGAAGGTGTT GTGTCTCTGG GTCTGTACTC ACAGATTTTC TACCGCAACA CCCAGGCGTC 2827
 TGGCGTATC CCACAGATCT CTTTGATC 2855

15

配列番号 : 2

配列の長さ : 543

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

20 配列の種類 : タンパク質

配列

Met Thr Ile Ser Ser Pro Leu Ile Asp Val Ala Asn Leu Pro Asp Ile
 1. 5 10 15
 Asn Thr Thr Ala Gly Lys Ile Ala Asp Leu Lys Ala Arg Arg Ala Glu
 25 20 25 30
 Ala His Phe Pro Met Gly Glu Lys Ala Val Glu Lys Val His Ala Ala
 35 40 45
 Gly Arg Leu Thr Ala Arg Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Leu Asp Glu Gly
 50 55 60
 30 Ser Phe Ile Glu Thr Asp Gln Leu Ala Arg His Arg Thr Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Gly Leu Gly Ala Lys Arg Pro Ala Thr Asp Gly Ile Val Thr Gly Trp
 85 90 95
 Gly Thr Ile Asp Gly Arg Glu Val Cys Ile Phe Ser Gln Asp Gly Thr
 35 100 105 110

Val Phe Gly Gly Ala Leu Gly Glu Val Tyr Gly Glu Lys Met Ile Lys
 115 120 125
 Ile Met Glu Leu Ala Ile Asp Thr Gly Arg Pro Leu Ile Gly Leu Tyr
 130 135 140
 5 Glu Gly Ala Gly Ala Arg Ile Gln Asp Gly Ala Val Ser Leu Asp Phe
 145 150 155 160
 Ile Ser Gln Thr Phe Tyr Gln Asn Ile Gln Ala Ser Gly Val Ile Pro
 165 170 175
 Gln Ile Ser Val Ile Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Asn Ala Tyr Gly
 10 180 185 190
 Pro Ala Leu Thr Asp Phe Val Val Met Val Asp Lys Thr Ser Lys Met
 195 200 205
 Phe Val Thr Gly Pro Asp Val Ile Lys Thr Val Thr Gly Glu Glu Ile
 210 215 220
 15 Thr Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala Thr Thr His Met Val Thr Ala Gly
 225 230 235 240
 Asn Ser His Tyr Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Ala Leu Asp Trp Val
 245 250 255
 Gln Asp Leu Val Ser Phe Leu Pro Ser Asn Asn Arg Ser Tyr Thr Pro
 20 260 265 270
 Leu Glu Asp Phe Asp Glu Glu Glu Gly Gly Val Glu Glu Asn Ile Thr
 275 280 285
 Ala Asp Asp Leu Lys Leu Asp Glu Ile Ile Pro Asp Ser Ala Thr Val
 290 295 300
 25 Pro Tyr Asp Val Arg Asp Val Ile Glu Cys Leu Thr Asp Asp Gly Glu
 305 310 315 320
 Tyr Leu Glu Ile Gln Ala Asp Arg Ala Glu Asn Val Val Ile Ala Phe
 325 330 335
 Gly Arg Ile Glu Gly Gln Ser Val Gly Phe Val Ala Asn Gln Pro Thr
 30 340 345 350
 Gln Phe Ala Gly Cys Leu Asp Ile Asp Ser Ser Glu Lys Ala Ala Arg
 355 360 365
 Phe Val Arg Thr Cys Asp Ala Phe Asn Ile Pro Ile Val Met Leu Val
 370 375 380
 35 Asp Val Pro Gly Phe Leu Pro Gly Ala Gly Gln Glu Tyr Gly Gly Ile

385 390 395 400
 Leu Arg Arg Gly Ala Lys Leu Leu Tyr Ala Tyr Gly Glu Ala Thr Val
 405 410 415
 Pro Lys Ile Thr Val Thr Met Arg Lys Ala Tyr Gly Gly Ala Tyr Cys
 5 420 425 430
 Val Met Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ser Asp Ile Asn Leu Ala Trp Pro
 435 440 445
 Thr Ala Gln Ile Ala Val Met Gly Ala Ala Gly Ala Val Gly Phe Ile
 450 455 460
 10 Tyr Arg Lys Glu Leu Met Ala Ala Asp Ala Lys Gly Leu Asp Thr Val
 465 470 475 480
 Ala Leu Ala Lys Ser Phe Glu Arg Glu Tyr Glu Asp His Met Leu Asn
 485 490 495
 Pro Tyr His Ala Ala Glu Arg Gly Leu Ile Asp Ala Val Ile Leu Pro
 15 500 505 510
 Ser Glu Thr Arg Gly Gln Ile Ser Arg Asn Leu Arg Leu Leu Lys His
 515 520 525
 Lys Asn Val Thr Arg Pro Ala Arg Lys His Gly Asn Met Pro Leu
 530 535 540

20

配列番号 : 3

配列の長さ : 1478

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

25 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名 : ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム

株名 : AJ12036

30 配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 89..1423

特徴を決定した方法 : S

配列

35 GGTACCCCTTT TTGTTTGGG CACATGTAGG GTGGCCGAAA CAAAGTAATA GGACAACAAC

60

	GCTCGACCGC GATTATTTT GGAGAATC ATG ACC TCA GCA TCT GCC CCA AGC	112
	Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser	
	1 5	
	TTT AAC CCC GGC AAG GGT CCC GGC TCA GCA GTC GGA ATT GCC CTT TTA	160
5	Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu	
	10 15 20	
	GGA TTC GGA ACA GTC GGC ACT GAG GTG ATG CGT CTG ATG ACC GAG TAC	208
	Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr	
	25 30 35 40	
10	GGT GAT GAA CTT GCG CAC CGC ATT GGT GGC CCA CTG GAG GTT CGT GGC	256
	Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly	
	45 50 55	
	ATT GCT GTT TCT GAT ATC TCA AAG CCA CGT GAA GGC GTT GCA CCT GAG	304
	Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu	
15	60 65 70	
	CTG CTC ACT GAG GAC GCT TTT GCA CTC ATC GAG CGC GAG GAT GTT GAC	352
	Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp	
	75 80 85	
	ATC GTC GTT GAG GTT ATC GGC GGC ATT GAG TAC CCA CGT GAG GTA GTT	400
20	Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val	
	90 95 100	
	CTC GCA GCT CTG AAG GCC GGC AAG TCT GTT GTT ACC GCC AAT AAG GCT	448
	Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala	
	105 110 115 120	
25	CTT GTT GCA GCT CAC TCT GCT GAG CTT GCT GAT GCA GCG GAA GCC GCA	496
	Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala	
	125 130 135	
	AAC GTT GAC CTG TAC TTC GAG GCT GCT GTT GCA GCC GCA ATT CCA GTG	544
	Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ile Pro Val	
30	140 145 150	
	GTT GGC CCA CTG CGT CGC TCC CTG GCT GGC GAT CAG ATC CAG TCT GTG	592
	Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val	
	155 160 165	
	ATG GGC ATC GTT AAC GGC ACC ACC AAC TTC ATC TTG GAC GCC ATG GAT	640
35	Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp	

	170	175	180	
	TCC ACC GGC GCT GAC TAT GCA GAT TCT TTG GCT GAG GCA ACT CGT TTG			688
	Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu			
	185	190	195	200
5	GGT TAC GCC GAA GCT GAT CCA ACT GCA GAC GTC GAA GGC CAT GAC GCC			736
	Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala			
	205	210	215	
	GCA TCC AAG GCT GCA ATT TTG GCA TCC ATC GCT TTC CAC ACC CGT GTT			784
	Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val			
10	220	225	230	
	ACC GCG GAT GAT GTG TAC TGC GAA GGT ATC AGC AAC ATC AGC GCT GCC			832
	Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala			
	235	240	245	
	GAC ATT GAG GCA GCA CAG CAG GCA GGC CAC ACC ATC AAG TTG TTG GCC			880
15	Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala			
	250	255	260	
	ATC TGT GAG AAG TTC ACC AAC AAG GAA GGA AAG TCG GCT ATT TCT GCT			928
	Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala			
	265	270	275	280
20	CGC GTG CAC CCG ACT CTA TTA CCT GTG TCC CAC CCA CTG GCG TCG GTA			976
	Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val			
	285	290	295	
	AAC AAG TCC TTT AAT GCA ATC TTT GTT GAA GCA GAA GCA GCT GGT CGC			1024
	Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg			
25	300	305	310	
	CTG ATG TTC TAC GGA AAC GGT GCA GGT GGC GCG CCA ACC GCG TCT GCT			1072
	Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala			
	315	320	325	
	GTG CTT GGC GAC GTC GTT GGT GCC GCA CGA AAC AAG GTG CAC GGT GGC			1120
30	Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly			
	330	335	340	
	CGT GCT CCA GGT GAG TCC ACC TAC GCT AAC CTG CCG ATC GCT GAT TTC			1168
	Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe			
	345	350	355	360
35	GGT GAG ACC ACC ACT CGT TAC CAC CTC GAC ATG GAT GTG GAA GAT CGC			1216

Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg
 365 370 375
 GTG GGC GTT TTG GCT GAA TTG GCT AGC CTG TTC TCT GAG CAA GGA ATC 1264
 Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile
 5 380 385 390
 TCC CTG CGT ACA ATC CGA CAG GAA GAG CGC GAT GAT GAT GCA CGT CTG 1312
 Ser Leu Arg Thr Ile Arg Gln Glu Glu Arg Asp Asp Asp Ala Arg Leu
 395 400 405
 ATC GTT GTC ACG CAC TCT GCG CTG GAA TCT GAT CTT TCC CGC ACC GTT 1360
 10 Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val
 410 415 420
 GAA CTG CTG AAG GCT AAG CCT GTT GTT AAG GCA ATC AAC AGT GTG ATC 1408
 Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile
 425 430 435 440
 15 CGC CTC GAA AGG GAC TAATTTTACT GACATGGCAA TTGAACTGAA CGTCGGTCGT 1463
 Arg Leu Glu Arg Asp
 445
 AAGGTTACCG TCACG 1478

20 配列番号 : 4
 配列の長さ : 445
 配列の型 : アミノ酸
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : タンパク質

25 配列
 Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu
 20 25 30
 30 Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile
 35 40 45
 Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys
 50 55 60
 Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala
 35 65 70 75 80

Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly
 85 90 95
 Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys
 100 105 110
 5 Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu
 115 120 125
 Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala
 130 135 140
 Ala Val Ala Ala Ala Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu
 10 145 150 155 160
 Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr
 165 170 175
 Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp
 180 185 190
 15 Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr
 195 200 205
 Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala
 210 215 220
 Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu
 20 225 230 235 240
 Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala
 245 250 255
 Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys
 260 265 270
 25 Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro
 275 280 285
 Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe
 290 295 300
 Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala
 30 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala
 325 330 335
 Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr
 340 345 350
 35 Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His

	355		360		365
	Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala				
	370		375		380
	Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg Gln Glu				
5	385		390		395 400
	Glu Arg Asp Asp Asp Ala Arg Leu Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu				
		405		410	415
	Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val				
		420		425	430
10	Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp				
		435		440	445

配列番号：5

配列の長さ：20

15 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

アンチセンス：NO

20 配列

CTGGGAAGGT GAATCGAATT

配列番号：6

配列の長さ：20

25 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

アンチセンス：YES

30 配列

TCCGAGGTTT GCAGAAGATC 20

配列番号：7

配列の長さ：4394

35 配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

- 5 生物名：ブレビバクテリウム：ラクトファーメンタム
株名：ATCC13869

配列の特徴

特徴を表す記号：C D S

存在位置：443..4213

- 10 特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：-35 signal

存在位置：281..287

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：-10 signal

- 15 存在位置：307..312

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：RBS

存在位置：421..428

特徴を決定した方法：S

- 20 特徴を表す記号：terminator

存在位置：4243..4281

特徴を決定した方法：S

配列

```

GTCGACAAGC AAAATCGAAG CGGCAGCTCG CCGCGTCGGA GCCTTAAACG CCATCGCGGC      60
25 CATCCCTGAT GGTTCATC ATCAAGTCGG TGAACGOGGG CGCAACCTGT CATCCGGACA      120
GCGCCAACTG ATCGCGCTGG CGCGCGGCGA ACTCATCGAG CCTTCATCA TGCTTCTCGA      180
CGAAGCCACC TCCACCTCG ACOCGCGCAC CGAAGCGGTT ATCCTCAACG CCTCCGATCG      240
AGTCACTAAG GGAOGCACCA GCATCATCGT CGCGCACCGC TTGGCAACCG CTAAAAGGGC      300
CGACCGTATT CTGTGTGTG AACAAAGGAG TATCATTGAG GACGGATCTC ACGACCGGTT      360
30 GTTGTCTGCT AACGGCACT ACGCCGCGAT GTGGCATTTA ATGGCCTGAC ACGTTATTTT      420
TAGGAGAACT GTCAACAAAT TA ATG CTA CAA CTG GGG CTT AGG CAT AAT CAG      472
          Met Leu Gln Leu Gly Leu Arg His Asn Gln
                1             5             10
CCA ACG ACC AAC GTT ACA GTG GAT AAA ATA AAG CTC AAT AAA CCC TCA      520
35 Pro Thr Thr Asn Val Thr Val Asp Lys Ile Lys Leu Asn Lys Pro Ser

```

		15		20		25		
		AGA AGC AAG GAA PAG AGG CGA GTA CCT GCC GTG AGC AGC GCT AGT ACT	568					
		Arg Ser Lys Glu Lys Arg Arg Val Pro Ala Val Ser Ser Ala Ser Thr						
		30		35		40		
5		TTC GGC CAG AAT GCG TGG CTG GTA GAC GAG ATG TTC CAG CAG TTC CAG	616					
		Phe Gly Gln Asn Ala Trp Leu Val Asp Glu Met Phe Gln Gln Phe Gln						
		45		50		55		
		AAG GAC CCC AAG TCC GTG GAC AAG GAA TGG AGA GAA CTC TTT GAG GCG	664					
		Lys Asp Pro Lys Ser Val Asp Lys Glu Trp Arg Glu Leu Phe Glu Ala						
10		60		65		70		
		CAG GGG GGA CCA AAT GCT ACC CCC GCT ACA ACA GAA GCA CAG CCT TCA	712					
		Gln Gly Gly Pro Asn Ala Thr Pro Ala Thr Thr Glu Ala Gln Pro Ser						
		75		80		85		90
		GCG CCC AAG GAG TCT GCG AAA CCA GCA CCA AAG GCT GCC CCT GCA GCC	760					
15		Ala Pro Lys Glu Ser Ala Lys Pro Ala Pro Lys Ala Ala Pro Ala Ala						
		95		100		105		
		AAG GCA GCA CCG CGC GTA GAA ACC AAG CCG GCC GCC AAG ACC GCC CCT	808					
		Lys Ala Ala Pro Arg Val Glu Thr Lys Pro Ala Ala Lys Thr Ala Pro						
		110		115		120		
20		AAG GCC AAG GAG TCC TCA GTG CCA CAG CAA CCT AAG CTT CCG GAG CCA	856					
		Lys Ala Lys Glu Ser Ser Val Pro Gln Gln Pro Lys Leu Pro Glu Pro						
		125		130		135		
		GGA CAA ACC CCA ATC AGG GGT ATT TTC AAG TCC ATC GCG AAG AAC ATG	904					
		Gly Gln Thr Pro Ile Arg Gly Ile Phe Lys Ser Ile Ala Lys Asn Met						
25		140		145		150		
		GAT ATC TCC CTG GAA ATC CCA ACC GCA ACC TCG GTT CGC GAT ATG CCA	952					
		Asp Ile Ser Leu Glu Ile Pro Thr Ala Thr Ser Val Arg Asp Met Pro						
		155		160		165		170
		GCT CGC CTC ATG TTC GAA AAC CGC GCG ATG GTC AAC GAT CAG CTC AAG	1000					
30		Ala Arg Leu Met Phe Glu Asn Arg Ala Met Val Asn Asp Gln Leu Lys						
		175		180		185		
		CGC ACC CGC GGT GGC AAG ATC TCC TTC ACC CAC ATC ATT GGC TAC GCC	1048					
		Arg Thr Arg Gly Gly Lys Ile Ser Phe Thr His Ile Ile Gly Tyr Ala						
		190		195		200		
35		ATG GTG AAG GCA GTC ATG GCT CAC CCG GAC ATG AAC AAC TCC TAC GAC	1096					

	Met Val Lys Ala Val Met Ala His Pro Asp Met Asn Asn Ser Tyr Asp	
	205 210 215	
	GTC ATC GAC GGC AAG CCA ACC CTG ATC GTG CCT GAG CAC ATC AAC CTG	1144
	Val Ile Asp Gly Lys Pro Thr Leu Ile Val Pro Glu His Ile Asn Leu	
5	220 225 230	
	GGC CTT GCC ATC GAC CTT CCT CAG AAG GAC GGC TCC CGC GCA CTT GTC	1192
	Gly Leu Ala Ile Asp Leu Pro Gln Lys Asp Gly Ser Arg Ala Leu Val	
	235 240 245 250	
	GTA GCA GCC ATC AAG GAA ACC GAG AAG ATG AAC TTC TCC GAG TTC CTC	1240
10	Val Ala Ala Ile Lys Glu Thr Glu Lys Met Asn Phe Ser Glu Phe Leu	
	255 260 265	
	GCA GCA TAC GAA GAC ATC GTG ACA CGC TCC CGC AAG GGC AAG CTC ACC	1288
	Ala Ala Tyr Glu Asp Ile Val Thr Arg Ser Arg Lys Gly Lys Leu Thr	
	270 275 280	
15	ATG GAT-GAC TAC CAG GGC GTT ACC GTT TCC TTG ACC AAC CCA GGT GGC	1336
	Met Asp Asp Tyr Gln Gly Val Thr Val Ser Leu Thr Asn Pro Gly Gly	
	285 290 295	
	ATC GGT ACC CGC CAC TCT GTC CCA CGT CTG ACC AAG GGC CAG GGC ACC	1384
	Ile Gly Thr Arg His Ser Val Pro Arg Leu Thr Lys Gly Gln Gly Thr	
20	300 305 310	
	ATC ATC GGT GTC GGT TCC ATG GAT TAC CCA GCA GAG TTC CAG GGC GCT	1432
	Ile Ile Gly Val Gly Ser Met Asp Tyr Pro Ala Glu Phe Gln Gly Ala	
	315 320 325 330	
	TCC GAA GAC CGC CTT GCA GAG CTC GGC GTT GGA AAG CTT GTC ACC ATC	1480
25	Ser Glu Asp Arg Leu Ala Glu Leu Gly Val Gly Lys Leu Val Thr Ile	
	335 340 345	
	ACC TCC ACC TAC GAT CAC CGC GTG ATC CAG GGT GCT GTG TCC GGT GAA	1528
	Thr Ser Thr Tyr Asp His Arg Val Ile Gln Gly Ala Val Ser Gly Glu	
	350 355 360	
30	TTC CTG CGT ACC ATG TCT CGC CTG CTC ACC GAT GAT TCC TTC TGG GAT	1576
	Phe Leu Arg Thr Met Ser Arg Leu Leu Thr Asp Asp Ser Phe Trp Asp	
	365 370 375	
	GAG ATC TTC GAC GCA ATG AAC GTT CCT TAC ACC CCA ATG CGT TGG GCA	1624
	Glu Ile Phe Asp Ala Met Asn Val Pro Tyr Thr Pro Met Arg Trp Ala	
35	380 385 390	

	CAG GAC GTT CCA AAC ACC GGT GTT GAT AAG AAC ACC CGC GTC ATG CAG	1672
	Gln Asp Val Pro Asn Thr Gly Val Asp Lys Asn Thr Arg Val Met Gln	
	395 400 405 410	
	CTC ATT GAG GCA TAC CGC TCC CGT GGA CAC CTC ATC GCT GAC ACC AAC	1720
5	Leu Ile Glu Ala Tyr Arg Ser Arg Gly His Leu Ile Ala Asp Thr Asn	
	415 420 425	
	CCA CTT TCA TGG GTT CAG CCT GGC ATG CCA GTT CCA GAC CAC CGC GAC	1768
	Pro Leu Ser Trp Val Gln Pro Gly Met Pro Val Pro Asp His Arg Asp	
	430 435 440	
10	CTC GAC ATC GAG ACC CAC AGC CTG ACC ATC TGG GAT CTG GAC CGT ACC	1816
	Leu Asp Ile Glu Thr His Ser Leu Thr Ile Trp Asp Leu Asp Arg Thr	
	445 450 455	
	TTC AGC GTC GGT GGC TTC GGC GGC AAG GAG ACC ATG ACC CTG CGC GAG	1864
	Phe Ser Val Gly Gly Phe Gly Gly Lys Glu Thr Met Thr Leu Arg Glu	
15	460 465 470	
	GTA CTG TCC CGC CTG CGC GCT GCC TAC ACC TTG AAG GTC GGC TCC GAA	1912
	Val Leu Ser Arg Leu Arg Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Val Gly Ser Glu	
	475 480 485 490	
	TAC ACC CAC ATC CTG GAC CGC GAC GAG CGC ACC TGG CTG CAG GAC CGC	1960
20	Tyr Thr His Ile Leu Asp Arg Asp Glu Arg Thr Trp Leu Gln Asp Arg	
	495 500 505	
	CTC GAA GCC GGA ATG CCA AAG CCA ACC CAG GCA GAG CAG AAG TAC ATC	2008
	Leu Glu Ala Gly Met Pro Lys Pro Thr Gln Ala Glu Gln Lys Tyr Ile	
	510 515 520	
25	CTG CAG AAG CTG AAC GCC GCA GAG GCT TTC GAG AAC TTC CTG CAG ACC	2056
	Leu Gln Lys Leu Asn Ala Ala Glu Ala Phe Glu Asn Phe Leu Gln Thr	
	525 530 535	
	AAG TAC GTC GGC CAG AAG CGC TTC TCC CTC GAA GGT GCA GAA GCT CTC	2104
	Lys Tyr Val Gly Gln Lys Arg Phe Ser Leu Glu Gly Ala Glu Ala Leu	
30	540 545 550	
	ATC CCA CTG ATG GAC TCC GCC ATC GAC ACC GCC GCA GGC CAG GGC CTC	2152
	Ile Pro Leu Met Asp Ser Ala Ile Asp Thr Ala Ala Gly Gln Gly Leu	
	555 560 565 570	
	GAC GAA GTT GTC ATC GGT ATG CCA CAC CGT GGT CGC CTC AAC GTG CTG	2200
35	Asp Glu Val Val Ile Gly Met Pro His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu	

	575	580	585	
	TTC AAC ATC GTG GGC AAG CCA CTG GCA TCC ATC TTC AAC GAG TTT GAA			2248
	Phe Asn Ile Val Gly Lys Pro Leu Ala Ser Ile Phe Asn Glu Phe Glu			
	590	595	600	
5	GGC CAA ATG GAG CAG GGC CAG ATC GGT GGC TCC GGT GAC GTG AAG TAC			2296
	Gly Gln Met Glu Gln Gly Gln Ile Gly Gly Ser Gly Asp Val Lys Tyr			
	605	610	615	
	CAC CTC GGT TCC GAA GGC CAG CAC CTG CAG ATG TTC GGC GAC GGC GAG			2344
	His Leu Gly Ser Glu Gly Gln His Leu Gln Met Phe Gly Asp Gly Glu			
10	620	625	630	
	ATC AAG GTC TCC CTG ACT GCT AAC CCG TCC CAC CTG GAA GCT GTT AAC			2392
	Ile Lys Val Ser Leu Thr Ala Asn Pro Ser His Leu Glu Ala Val Asn			
	635	640	645	650
	CCA GTG ATG GAA GGT ATC GTC CGC GCA AAG CAG GAC TAC CTG GAC AAG			2440
15	Pro Val Met Glu Gly Ile Val Arg Ala Lys Gln Asp Tyr Leu Asp Lys			
	655	660	665	
	GGC GTA GAC GGC AAG ACT GTT GTG CCA CTG CTG CTC CAC GGT GAC GCT			2488
	Gly Val Asp Gly Lys Thr Val Val Pro Leu Leu Leu His Gly Asp Ala			
	670	675	680	
20	GCA TTC GCA GGC CTG GGC ATC GTG CCA GAA ACC ATC AAC CTG GCT AAG			2536
	Ala Phe Ala Gly Leu Gly Ile Val Pro Glu Thr Ile Asn Leu Ala Lys			
	685	690	695	
	CTG CGT GGC TAC GAC GTC GGA GGC ACC ATC CAC ATC GTG GTG AAC AAC			2584
	Leu Arg Gly Tyr Asp Val Gly Gly Thr Ile His Ile Val Val Asn Asn			
25	700	705	710	
	CAG ATC GGC TTC ACC ACC ACC CCA GAC TCC AGC CGC TCC ATG CAC TAC			2632
	Gln Ile Gly Phe Thr Thr Thr Pro Asp Ser Ser Arg Ser Met His Tyr			
	715	720	725	730
	GCA ACC GAC TAC GGC AAG GCA TTC GGC TGC CCA GTC TTC CAC GTC AAT			2680
30	Ala Thr Asp Tyr Ala Lys Ala Phe Gly Cys Pro Val Phe His Val Asn			
	735	740	745	
	GGT GAT GAC CCA GAG GCA GTT GTC TGG GTT GGC CAG CTG GCA ACC GAG			2728
	Gly Asp Asp Pro Glu Ala Val Val Trp Val Gly Gln Leu Ala Thr Glu			
	750	755	760	
35	TAC CGT CGT CGC TTC GGC AAG GAC GTC TTC ATC GAC CTC GTT TGC TAC			2776

	Tyr	Arg	Arg	Arg	Phe	Gly	Lys	Asp	Val	Phe	Ile	Asp	Leu	Val	Cys	Tyr	
		765					770					775					
	CGC	CTC	CGC	GGC	CAC	AAC	GAA	GCT	GAT	GAT	OCT	TCC	ATG	ACC	CAG	CCA	2824
	Arg	Leu	Arg	Gly	His	Asn	Glu	Ala	Asp	Asp	Pro	Ser	Met	Thr	Gln	Pro	
5		780					785					790					
	AAG	ATG	TAT	GAG	CTC	ATC	ACC	GGC	CGC	GAG	ACC	GTT	CGT	GCT	CAG	TAC	2872
	Lys	Met	Tyr	Glu	Leu	Ile	Thr	Gly	Arg	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Gln	Tyr	
		795				800				805				810			
	ACC	GAA	GAC	CTG	CTC	GGA	CGT	GGA	GAC	CTC	TCC	AAC	GAA	GAT	GCA	GAA	2920
10	Thr	Glu	Asp	Leu	Leu	Gly	Arg	Gly	Asp	Leu	Ser	Asn	Glu	Asp	Ala	Glu	
				815				820					825				
	GCA	GTC	GTC	CGC	GAC	TTC	CAC	GAC	CAG	ATG	GAA	TCT	GTG	TTC	AAC	GAA	2968
	Ala	Val	Val	Arg	Asp	Phe	His	Asp	Gln	Met	Glu	Ser	Val	Phe	Asn	Glu	
			830			835				840							
15	GTC	AAG	GAA	GGC	GGC	AAG	AAG	CAG	GCT	GAG	GCA	CAG	ACC	GGC	ATC	ACC	3016
	Val	Lys	Glu	Gly	Gly	Lys	Lys	Gln	Ala	Glu	Ala	Gln	Thr	Gly	Ile	Thr	
		845				850				855							
	GGC	TCC	CAG	AAG	CTT	CCA	CAC	GGC	CTT	GAG	ACC	AAC	ATC	TCC	CGT	GAA	3064
	Gly	Ser	Gln	Lys	Leu	Pro	His	Gly	Leu	Glu	Thr	Asn	Ile	Ser	Arg	Glu	
20		860				865				870							
	GAG	CTC	CTG	GAA	CTG	GGA	CAG	GCT	TTC	GCC	AAC	ACC	CCA	GAA	GGC	TTC	3112
	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Gly	Gln	Ala	Phe	Ala	Asn	Thr	Pro	Glu	Gly	Phe	
		875			880			885					890				
	AAC	TAC	CAC	CCA	CGT	GTG	GCT	CCA	GTT	GCT	AAG	AAG	CGC	GTC	TCC	TCT	3160
25	Asn	Tyr	His	Pro	Arg	Val	Ala	Pro	Val	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Ser	Ser	
			895			900				905							
	GTC	ACC	GAA	GGT	GGC	ATC	GAC	TGG	GCA	TGG	GGC	GAG	CTC	CTC	GCC	TTC	3208
	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	Ile	Asp	Trp	Ala	Trp	Gly	Glu	Leu	Leu	Ala	Phe	
		910			915			920									
30	GGT	TCC	CTG	GCT	AAC	TCC	GGC	CGC	TTG	GTT	CGC	CTT	GCA	GGT	GAA	GAT	3256
	Gly	Ser	Leu	Ala	Asn	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Arg	Leu	Ala	Gly	Glu	Asp	
		925			930			935									
	TCC	CGC	CGC	GGT	ACC	TTC	ACC	CAG	CGC	CAC	GCA	GTT	GCC	ATC	GAC	CCA	3304
	Ser	Arg	Arg	Gly	Thr	Phe	Thr	Gln	Arg	His	Ala	Val	Ala	Ile	Asp	Pro	
35		940				945				950							

	GCG ACC GCT GAA GAG TTC AAC CCA CTC CAC GAG CTT GCA CAG TCC AAG	3352
	Ala Thr Ala Glu Glu Phe Asn Pro Leu His Glu Leu Ala Gln Ser Lys	
	955 960 965 970	
	GGC AAC AAC GGT AAG TTC CTG GTC TAC AAC TCC GCA CTG ACC GAG TAC	3400
5	Gly Asn Asn Gly Lys Phe Leu Val Tyr Asn Ser Ala Leu Thr Glu Tyr	
	975 980 985	
	GCA GGC ATG GGC TTC GAG TAC GGC TAC TCC GTA GGA AAC GAA GAC TCC	3448
	Ala Gly Met Gly Phe Glu Tyr Gly Tyr Ser Val Gly Asn Glu Asp Ser	
	990 995 1000	
10	GTC GTT GCA TGG GAA GCA CAG TTC GGC GAC TTC GCC AAC GGC GCT CAG	3496
	Val Val Ala Trp Glu Ala Gln Phe Gly Asp Phe Ala Asn Gly Ala Gln	
	1005 1010 1015	
	ACC ATC ATC GAT GAG TAC GTC TCC TCA GGC GAA GCT AAG TGG GGC CAG	3544
	Thr Ile Ile Asp Glu Tyr Val Ser Ser Gly Glu Ala Lys Trp Gly Gln	
15	1020 1025 1030	
	ACC TCC AAG CTG ATC CTT CTG CTG CCT CAC GGC TAC GAA GGC CAG GGC	3592
	Thr Ser Lys Leu Ile Leu Leu Leu Pro His Gly Tyr Glu Gly Gln Gly	
	1035 1040 1045 1050	
	CCA GAC CAC TCT TCC GCA CGT ATC GAG CGC TTC CTG CAG CTG TGC GCT	3640
20	Pro Asp His Ser Ser Ala Arg Ile Glu Arg Phe Leu Gln Leu Cys Ala	
	1055 1060 1065	
	GAG GGT TCC ATG ACT GTT GCT CAG CCA TCC ACC CCA GCA AAC CAC TTC	3688
	Glu Gly Ser Met Thr Val Ala Gln Pro Ser Thr Pro Ala Asn His Phe	
	1070 1075 1080	
25	CAC CTG CTG CGT CGT CAC GCT CTG TCC GAC CTG AAG CGT CCA CTG GTT	3736
	His Leu Leu Arg Arg His Ala Leu Ser Asp Leu Lys Arg Pro Leu Val	
	1085 1090 1095	
	ATC TTC ACC CCG AAG TCC ATG CTG CGT AAC AAG GCT GCT GCC TCC GCA	3784
	Ile Phe Thr Pro Lys Ser Met Leu Arg Asn Lys Ala Ala Ala Ser Ala	
30	1100 1105 1110	
	CCA GAA GAC TTC ACT GAG GTC ACC AAG TTC CAA TCC GTG ATC GAC GAT	3832
	Pro Glu Asp Phe Thr Glu Val Thr Lys Phe Gln Ser Val Ile Asp Asp	
	1115 1120 1125 1130	
	CCA AAC GTT GCA GAT GCA GCC AAG GTG AAG AAG GTC ATG CTG GTC TCC	3880
35	Pro Asn Val Ala Asp Ala Ala Lys Val Lys Lys Val Met Leu Val Ser	

		1135	1140	1145	
		GGC AAG CTG TAC TAC GAA TTG GCA AAG CGC AAG GAG AAG GAC GGA CGC			3928
		Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Leu Ala Lys Arg Lys Glu Lys Asp Gly Arg			
		1150	1155	1160	
5		GAC GAC ATC GCG ATC GTT CGT ATC GAA ATG CTC CAC CCA ATT CCG TTC			3976
		Asp Asp Ile Ala Ile Val Arg Ile Glu Met Leu His Pro Ile Pro Phe			
		1165	1170	1175	
		AAC CGC ATC TCC GAG GCT CTT GCC GGC TAC CCT AAC GCT GAG GAA GTC			4024
		Asn Arg Ile Ser Glu Ala Leu Ala Gly Tyr Pro Asn Ala Glu Glu Val			
10		1180	1185	1190	
		CTC TTC GTT CAG GAT GAG CCA GCA AAC CAG GGC CCA TGG CCG TTC TAC			4072
		Leu Phe Val Gln Asp Glu Pro Ala Asn Gln Gly Pro Trp Pro Phe Tyr			
		1195	1200	1205	1210
		CAG GAG CAC CTC CCA GAG CTG ATC CCG AAC ATG CCA AAG ATG CGC CGC			4120
15		Gln Glu His Leu Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Pro Lys Met Arg Arg			
		1215	1220	1225	
		GTT TCC CGC CGC GCT CAG TCC TCC ACC GCA ACT GGT GTT GCT AAG GTG			4168
		Val Ser Arg Arg Ala Gln Ser Ser Thr Ala Thr Gly Val Ala Lys Val			
		1230	1235	1240	
20		CAC CAG CTG GAG GAG AAG CAG CTT ATC GAC GAG GCT TTC GAG GCT			4213
		His Gln Leu Glu Glu Lys Gln Leu Ile Asp Glu Ala Phe Glu Ala			
		1245	1250	1255	
		TAAGTCTTTA TAGTCTGCA CTAGCCTAGA GGGCCTTATG CAGTGTGAAT CACACAGCAT			4273
		AAGGCCCTTT TTGCTGCGT GGTGGOCTAA GGTGGAAGGC ATGAAACGAA TCTGTGCGGT			4333
25		CACGATCTCT TCAGTACTTT TGCTAAGTGG CTGCTCTCC ACTTCCACCA CGCAGCTCGA			4393
		G			4394

配列番号：8

配列の長さ：1257

30 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Leu Gln Leu Gly Leu Arg His Asn Gln Pro Thr Thr Asn Val Thr

35 1 5 10 15

Val Asp Lys Ile Lys Leu Asn Lys Pro Ser Arg Ser Lys Glu Lys Arg
 20 25 30
 Arg Val Pro Ala Val Ser Ser Ala Ser Thr Phe Gly Gln Asn Ala Trp
 35 40 45
 5 Leu Val Asp Glu Met Phe Gln Gln Phe Gln Lys Asp Pro Lys Ser Val
 50 55 60
 Asp Lys Glu Trp Arg Glu Leu Phe Glu Ala Gln Gly Gly Pro Asn Ala
 65 70 75 80
 Thr Pro Ala Thr Thr Glu Ala Gln Pro Ser Ala Pro Lys Glu Ser Ala
 10 85 90 95
 Lys Pro Ala Pro Lys Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ala Ala Pro Arg Val
 100 105 110
 Glu Thr Lys Pro Ala Ala Lys Thr Ala Pro Lys Ala Lys Glu Ser Ser
 115 120 125
 15 Val Pro Gln Gln Pro Lys Leu Pro Glu Pro Gly Gln Thr Pro Ile Arg
 130 135 140
 Gly Ile Phe Lys Ser Ile Ala Lys Asn Met Asp Ile Ser Leu Glu Ile
 145 150 155 160
 Pro Thr Ala Thr Ser Val Arg Asp Met Pro Ala Arg Leu Met Phe Glu
 20 165 170 175
 Asn Arg Ala Met Val Asn Asp Gln Leu Lys Arg Thr Arg Gly Gly Lys
 180 185 190
 Ile Ser Phe Thr His Ile Ile Gly Tyr Ala Met Val Lys Ala Val Met
 195 200 205
 25 Ala His Pro Asp Met Asn Asn Ser Tyr Asp Val Ile Asp Gly Lys Pro
 210 215 220
 Thr Leu Ile Val Pro Glu His Ile Asn Leu Gly Leu Ala Ile Asp Leu
 225 230 235 240
 Pro Gln Lys Asp Gly Ser Arg Ala Leu Val Val Ala Ala Ile Lys Glu
 30 245 250 255
 Thr Glu Lys Met Asn Phe Ser Glu Phe Leu Ala Ala Tyr Glu Asp Ile
 260 265 270
 Val Thr Arg Ser Arg Lys Gly Lys Leu Thr Met Asp Asp Tyr Gln Gly
 275 280 285
 35 Val Thr Val Ser Leu Thr Asn Pro Gly Gly Ile Gly Thr Arg His Ser

	290	295	300
	Val Pro Arg Leu Thr Lys Gly Gln Gly Thr Ile Ile Gly Val Gly Ser		
	305	310	315 320
	Met Asp Tyr Pro Ala Glu Phe Gln Gly Ala Ser Glu Asp Arg Leu Ala		
5	325	330	335
	Glu Leu Gly Val Gly Lys Leu Val Thr Ile Thr Ser Thr Tyr Asp His		
	340	345	350
	Arg Val Ile Gln Gly Ala Val Ser Gly Glu Phe Leu Arg Thr Met Ser		
	355	360	365
10	Arg Leu Leu Thr Asp Asp Ser Phe Trp Asp Glu Ile Phe Asp Ala Met		
	370	375	380
	Asn Val Pro Tyr Thr Pro Met Arg Trp Ala Gln Asp Val Pro Asn Thr		
	385	390	395 400
	Gly Val Asp Lys Asn Thr Arg Val Met Gln Leu Ile Glu Ala Tyr Arg		
15	405	410	415
	Ser Arg Gly His Leu Ile Ala Asp Thr Asn Pro Leu Ser Trp Val Gln		
	420	425	430
	Pro Gly Met Pro Val Pro Asp His Arg Asp Leu Asp Ile Glu Thr His		
	435	440	445
20	Ser Leu Thr Ile Trp Asp Leu Asp Arg Thr Phe Ser Val Gly Gly Phe		
	450	455	460
	Gly Gly Lys Glu Thr Met Thr Leu Arg Glu Val Leu Ser Arg Leu Arg		
	465	470	475 480
	Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Val Gly Ser Glu Tyr Thr His Ile Leu Asp		
25	485	490	495
	Arg Asp Glu Arg Thr Trp Leu Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gly Met Pro		
	500	505	510
	Lys Pro Thr Gln Ala Glu Gln Lys Tyr Ile Leu Gln Lys Leu Asn Ala		
	515	520	525
30	Ala Glu Ala Phe Glu Asn Phe Leu Gln Thr Lys Tyr Val Gly Gln Lys		
	530	535	540
	Arg Phe Ser Leu Glu Gly Ala Glu Ala Leu Ile Pro Leu Met Asp Ser		
	545	550	555 560
	Ala Ile Asp Thr Ala Ala Gly Gln Gly Leu Asp Glu Val Val Ile Gly		
35	565	570	575

Met Pro His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu Phe Asn Ile Val Gly Lys
 580 585 590
 Pro Leu Ala Ser Ile Phe Asn Glu Phe Glu Gly Gln Met Glu Gln Gly
 595 600 605
 5 Gln Ile Gly Gly Ser Gly Asp Val Lys Tyr His Leu Gly Ser Glu Gly
 610 615 620
 Gln His Leu Gln Met Phe Gly Asp Gly Glu Ile Lys Val Ser Leu Thr
 625 630 635 640
 Ala Asn Pro Ser His Leu Glu Ala Val Asn Pro Val Met Glu Gly Ile
 10 645 650 655
 Val Arg Ala Lys Gln Asp Tyr Leu Asp Lys Gly Val Asp Gly Lys Thr
 660 665 670
 Val Val Pro Leu Leu Leu His Gly Asp Ala Ala Phe Ala Gly Leu Gly
 675 680 685
 15 Ile Val Pro Glu Thr Ile Asn Leu Ala Lys Leu Arg Gly Tyr Asp Val
 690 695 700
 Gly Gly Thr Ile His Ile Val Val Asn Asn Gln Ile Gly Phe Thr Thr
 705 710 715 720
 Thr Pro Asp Ser Ser Arg Ser Met His Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Lys
 20 725 730 735
 Ala Phe Gly Cys Pro Val Phe His Val Asn Gly Asp Asp Pro Glu Ala
 740 745 750
 Val Val Trp Val Gly Gln Leu Ala Thr Glu Tyr Arg Arg Arg Phe Gly
 755 760 765
 25 Lys Asp Val Phe Ile Asp Leu Val Cys Tyr Arg Leu Arg Gly His Asn
 770 775 780
 Glu Ala Asp Asp Pro Ser Met Thr Gln Pro Lys Met Tyr Glu Leu Ile
 785 790 795 800
 Thr Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Gln Tyr Thr Glu Asp Leu Leu Gly
 30 805 810 815
 Arg Gly Asp Leu Ser Asn Glu Asp Ala Glu Ala Val Val Arg Asp Phe
 820 825 830
 His Asp Gln Met Glu Ser Val Phe Asn Glu Val Lys Glu Gly Gly Lys
 835 840 845
 35 Lys Gln Ala Glu Ala Gln Thr Gly Ile Thr Gly Ser Gln Lys Leu Pro

	850	855	860
	His Gly Leu Glu Thr Asn Ile Ser Arg Glu Glu Leu Leu Glu Leu Gly		
	865	870	875 880
	Gln Ala Phe Ala Asn Thr Pro Glu Gly Phe Asn Tyr His Pro Arg Val		
5	885	890	895
	Ala Pro Val Ala Lys Lys Arg Val Ser Ser Val Thr Glu Gly Gly Ile		
	900	905	910
	Asp Trp Ala Trp Gly Glu Leu Leu Ala Phe Gly Ser Leu Ala Asn Ser		
	915	920	925
10	Gly Arg Leu Val Arg Leu Ala Gly Glu Asp Ser Arg Arg Gly Thr Phe		
	930	935	940
	Thr Gln Arg His Ala Val Ala Ile Asp Pro Ala Thr Ala Glu Glu Phe		
	945	950	955 960
	Asn Pro Leu His Glu Leu Ala Gln Ser Lys Gly Asn Asn Gly Lys Phe		
15	965	970	975
	Leu Val Tyr Asn Ser Ala Leu Thr Glu Tyr Ala Gly Met Gly Phe Glu		
	980	985	990
	Tyr Gly Tyr Ser Val Gly Asn Glu Asp Ser Val Val Ala Trp Glu Ala		
	995	1000	1005
20	Gln Phe Gly Asp Phe Ala Asn Gly Ala Gln Thr Ile Ile Asp Glu Tyr		
	1010	1015	1020
	Val Ser Ser Gly Glu Ala Lys Trp Gly Gln Thr Ser Lys Leu Ile Leu		
	1025	1030	1035 1040
	Leu Leu Pro His Gly Tyr Glu Gly Gln Gly Pro Asp His Ser Ser Ala		
25	1045	1050	1055
	Arg Ile Glu Arg Phe Leu Gln Leu Cys Ala Glu Gly Ser Met Thr Val		
	1060	1065	1070
	Ala Gln Pro Ser Thr Pro Ala Asn His Phe His Leu Leu Arg Arg His		
	1075	1080	1085
30	Ala Leu Ser Asp Leu Lys Arg Pro Leu Val Ile Phe Thr Pro Lys Ser		
	1090	1095	1100
	Met Leu Arg Asn Lys Ala Ala Ala Ser Ala Pro Glu Asp Phe Thr Glu		
	1105	1110	1115 1120
	Val Thr Lys Phe Gln Ser Val Ile Asp Asp Pro Asn Val Ala Asp Ala		
35	1125	1130	1135

Ala Lys Val Lys Lys Val Met Leu Val Ser Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu
 1140 1145 1150
 Leu Ala Lys Arg Lys Glu Lys Asp Gly Arg Asp Asp Ile Ala Ile Val
 1155 1160 1165
 5 Arg Ile Glu Met Leu His Pro Ile Pro Phe Asn Arg Ile Ser Glu Ala
 1170 1175 1180
 Leu Ala Gly Tyr Pro Asn Ala Glu Glu Val Leu Phe Val Gln Asp Glu
 185 1190 1195 1200
 Pro Ala Asn Gln Gly Pro Trp Pro Phe Tyr Gln Glu His Leu Pro Glu
 10 1205 1210 1215
 Leu Ile Pro Asn Met Pro Lys Met Arg Arg Val Ser Arg Arg Ala Gln
 1220 1225 1230
 Ser Ser Thr Ala Thr Gly Val Ala Lys Val His Gln Leu Glu Glu Lys
 1235 1240 1245
 15 Gln Leu Ile Asp Glu Ala Phe Glu Ala
 1250 1255

配列番号 : 9

配列の長さ : 20

20 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

アンチセンス : NO

25 配列

CTGTCTGAAG GATCGGTTCT 20

配列番号 : 10

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

30 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

アンチセンス : YES

配列

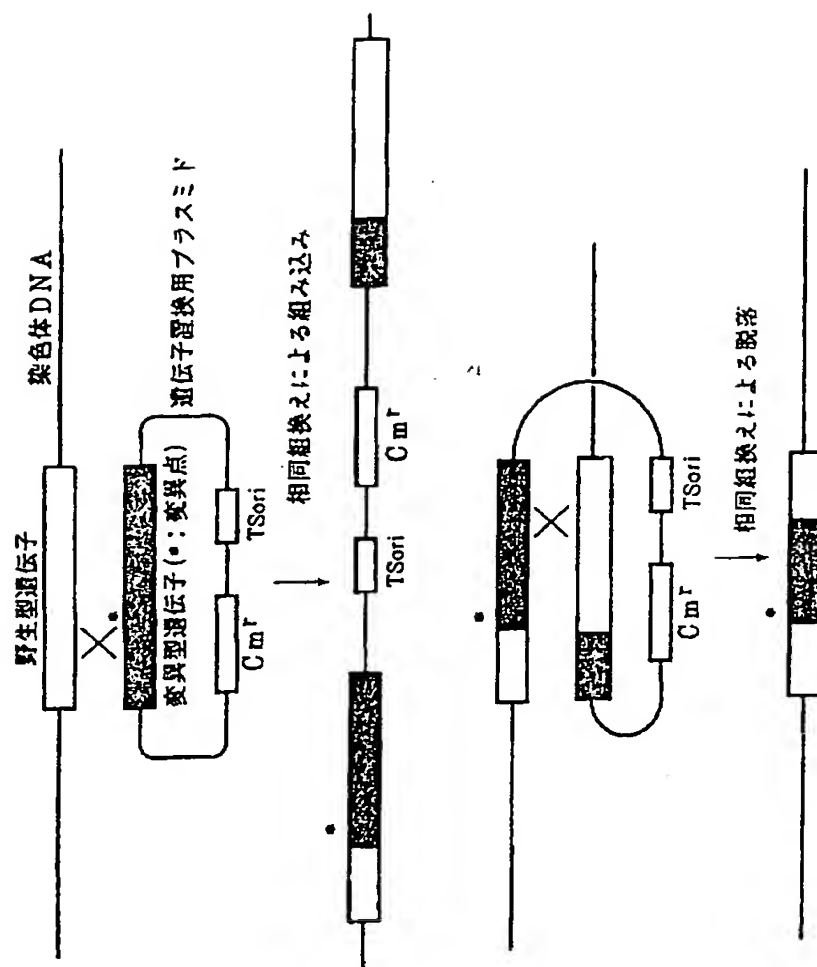
35 GAGTGCTCAG GCCCCTGTCC CTCGTAACC 29

請求の範囲

1. 目的物質の産生に不利に作用する遺伝子と、温度感受性複製起点とを含むプラスミドを保持する微生物。
2. 機能可能な前記遺伝子が前記プラスミド上のみに存在する請求項 1 記載の微生物。
3. 前記遺伝子が、目的物質の生合成系路から分岐する他の経路に属する酵素をコードする遺伝子である請求項 1 記載の微生物。
4. 前記遺伝子が、微生物の生育にとって有利に作用する遺伝子である請求項 1 記載の微生物。
5. 目的物質がアミノ酸である請求項 1 記載の微生物。
6. 目的物質が L-グルタミン酸であり、前記遺伝子が *dt s R* 遺伝子である請求項 5 記載の微生物。
7. 目的物質が L-グルタミン酸であり、前記遺伝子が α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子である請求項 5 記載の微生物。
8. 目的物質が L-リジンであり、前記遺伝子がホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子である請求項 5 記載の微生物。
9. 微生物がコリネ型細菌である請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の微生物。
10. 微生物が *rec A*-である請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の微生物。
11. 請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の微生物を、前記プラスミドが複製可能な温度で培養して増殖させる工程と、前記プラスミドが複製不能な温度で培養してプラスミドを細胞から脱落させ、目的物質を産生させる工程とを含む、発酵法による目的物質の製造法。

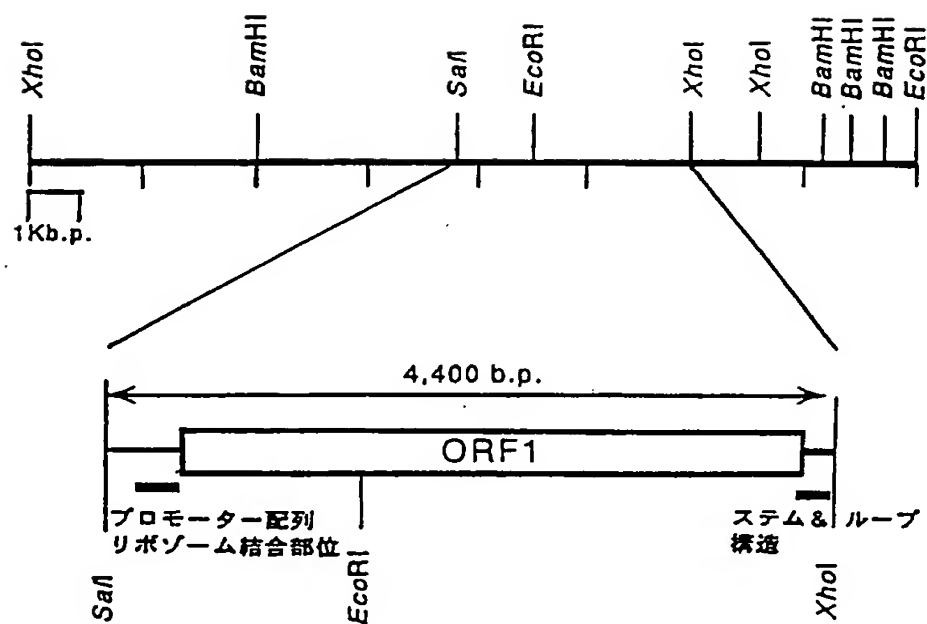
1 / 2

Fig. 1



2 / 2

F i g . 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N1/21, C12P13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N1/21, C12N15/52, C12P13/00, C12N15/63

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

F-term, WPI/WPI,L, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP, 5-7491, A (Ajinomoto K.K.), January 19, 1993 (19. 01. 93) & US, 5616480, A	1-5, 7-10/11
A	JP, 5-344881, A (Ajinomoto K.K.), December 27, 1993 (27. 12. 93) (Family: none)	1 - 11
Y/A	JP, 61-260892, A (Kyowa Hakko Kogyo K.K.), November 19, 1986 (19. 11. 86) (Family: none)	1-5, 9, 10/ 6-8, 11
Y/A	JP, 59-156283, A (Nederland ORG TNO), September 5, 1984 (05. 09. 84) & EP, 105554, A	1-5, 7-10/11
Y/A	JP, 6-197780, A (Degussa AG.), July 19, 1994 (19. 07. 94) & EP, 555661, A	2/1, 3-11
Y/A	JP, 60-12995, A (Ajinomoto K.K.), January 23, 1985 (23. 01. 85) & US, 4601983, A & EP, 131171, A	1-5, 8-10/ 6, 7, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 27, 1997 (27. 08. 97)Date of mailing of the international search report
September 9, 1997 (09. 09. 97)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01886

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 9534672, A (Ajinomoto K.K.), December 21, 1995 (21. 12. 95) & EP, 771879, A & JP, 8-501926, A	1 - 11
PY/PA	Biosci. Biotechnol. Biochem. 60(10).1996. Kimura E. et al. "Molecular cloning of a novel gene, <i>dstR</i> , which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from <i>Brevibacterium</i> <i>lactofermentum</i> " p. 1565-1570	1-6, 9, 10/ 7, 8, 11
PA	Biochem. Biophys. Res. Commun. 234(1) 1997 Kimura E. et al. "A <i>dstR</i> gene-desrupted mutant of <i>Brevibacterium lactofermentum</i> requires fatty acids for growth and efficiently produces L- glutamate in the presence of an excess of biotin" p. 157-161	1 - 11
A	WO, 9523224, A (Ajinomoto K.K.), August 31, 1995 (31. 08. 95) & JP, 7-522258, A & EP, 752472, A	1 - 11
Y	"Nikkei Baio Saishin-Yogo Jiten 4th edition (in Japanese)" edited by Nikkei Baioteku (Nikkei BP sha) 1995, p. 758-759	10
Y	Eur. J. Biochem. 141(2) 1984 Darlison MG et al. "Nucleotide sequence of the <i>sucA</i> gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of <i>Escherichia</i> <i>coli</i> K12." P. 351-359	7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/01886

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁴ C12N1/21, C12P13/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁴ C12N1/21, C12N15/52, C12P13/00, C12N15/63

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

F-term WPI/WPI.L BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	JP, 5-7491, A (AJINOMOTO KK) 19. 1月. 1993 (19. 01. 93) & US, 5616480, A	1-5, 7-10/11
A	JP, 5-344881, A (AJINOMOTO KK) 27. 12月. 1993 (27. 12. 93) (Family: none)	1-11
Y/A	JP, 61-260892, A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 19. 11月. 1986 (19. 11. 86) (Family: none)	1-5, 9, 10/6-8, 11
Y/A	JP, 59-156283, A (NEDERLAND ORG TNO) 5. 9月. 1984 (05. 09. 84) & EP, 105554, A	1-5, 7-10/11
Y/A	JP, 6-197780, A (DEGUSSA AG) 19. 7月. 1994 (19. 07. 94) & EP, 555661, A	2/1, 3-11
Y/A	JP, 60-12995, A (AJINOMOTO KK) 23. 1月. 1985 (23. 01. 85) & US, 4601983, A & EP, 131171, A	1-5, 8-10/6, 7, 11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 08. 97

国際調査報告の発送日

09.09.97

国際調査機関の名称及びて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 美奈子

印

4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 9534672, A (AJINOMOTO KK) 21. 12月. 1995 (21. 12. 95) & EP, 771879, A & JP, 8-501926, A	1-11
PY/PA	Biosci. Biotechnol. Biochem. 60(10) 1996 Kimura E. et al. 「Molecular cloning of a novel gene, dstR, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from Brevibacterium lactofermentum」 p. 1565-1570	1-6, 9, 10/7, 8, 11
PA	Biochem. Biophys. Res. Commun. 234(1) 1997 Kimura E. et al. 「A dstR gene-desrupted mutant of Brevibacterium lactofermentum requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin」 p. 157-161	1-11
A	WO, 9523224, A (AJINOMOTO KK) 31. 8月. 1995 (31. 08. 95) & JP, 7-522258, A & EP, 752472, A	1-11
Y	日経バイオテク編「日経バイオ最新用語辞典 第四版」(日経BP社) 1995 P. 758-759	10
Y	Eur. J. Biochem. 141(2) 1984 Darlison MG et al. 「Nucleotide sequence of the sucA gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of Escherichia coli K12.」 P. 351-359	7